

**Zur Standardisierung der
Extraktion von aufgeschlossenem Milcheiweiß
aus erhitzten Fleischerzeugnissen
für den serologischen Nachweis**

Edgar von Pickardt

1973



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554601_0053

Aus dem Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der
Lebensmittel tierischen Ursprungs der
Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Vorstand: Professor Dr. Dr.h.c. L. Kotter

Zur Standardisierung
der Extraktion von aufgeschlossenem Milcheiweiß
aus erhitzten Fleischerzeugnissen
für den serologischen Nachweis

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig - Maximilians - Universität
München

von

Edgar von Pickardt

aus

Litzmannstadt

München 1973



Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen
Fakultät der Universität München

Dekan:	Prof. Dr. E. Dahme
Referent:	Prof. Dr. Dr.h.c. L. Kotter
Korreferent:	Priv.Do. Dr. U. Lösch

Tag der Promotion: 27. Juli 1973

IN DANKBARKEIT MEINER MUTTER

1. Einleitung	1
2. Die Mutter als Vorbild	2
3. Die Mutter als Erzieherin	3
4. Die Mutter als Freundin	4
5. Die Mutter als Helferin	5
6. Die Mutter als Beraterin	6
7. Die Mutter als Beschützerin	7
8. Die Mutter als Vermittlerin	8
9. Die Mutter als Organisatorin	9
10. Die Mutter als Inspiratorin	10
11. Die Mutter als Motivatorin	11
12. Die Mutter als Unterstützerin	12
13. Die Mutter als Beraterin	13
14. Die Mutter als Helferin	14
15. Die Mutter als Beschützerin	15
16. Die Mutter als Vermittlerin	16
17. Die Mutter als Organisatorin	17
18. Die Mutter als Inspiratorin	18
19. Die Mutter als Motivatorin	19
20. Die Mutter als Unterstützerin	20
21. Die Mutter als Beraterin	21
22. Die Mutter als Helferin	22
23. Die Mutter als Beschützerin	23
24. Die Mutter als Vermittlerin	24
25. Die Mutter als Organisatorin	25
26. Die Mutter als Inspiratorin	26
27. Die Mutter als Motivatorin	27
28. Die Mutter als Unterstützerin	28
29. Die Mutter als Beraterin	29
30. Die Mutter als Helferin	30
31. Die Mutter als Beschützerin	31
32. Die Mutter als Vermittlerin	32
33. Die Mutter als Organisatorin	33
34. Die Mutter als Inspiratorin	34
35. Die Mutter als Motivatorin	35
36. Die Mutter als Unterstützerin	36
37. Die Mutter als Beraterin	37
38. Die Mutter als Helferin	38
39. Die Mutter als Beschützerin	39
40. Die Mutter als Vermittlerin	40
41. Die Mutter als Organisatorin	41
42. Die Mutter als Inspiratorin	42
43. Die Mutter als Motivatorin	43
44. Die Mutter als Unterstützerin	44
45. Die Mutter als Beraterin	45
46. Die Mutter als Helferin	46
47. Die Mutter als Beschützerin	47
48. Die Mutter als Vermittlerin	48
49. Die Mutter als Organisatorin	49
50. Die Mutter als Inspiratorin	50
51. Die Mutter als Motivatorin	51
52. Die Mutter als Unterstützerin	52
53. Die Mutter als Beraterin	53
54. Die Mutter als Helferin	54
55. Die Mutter als Beschützerin	55
56. Die Mutter als Vermittlerin	56
57. Die Mutter als Organisatorin	57
58. Die Mutter als Inspiratorin	58
59. Die Mutter als Motivatorin	59
60. Die Mutter als Unterstützerin	60
61. Die Mutter als Beraterin	61
62. Die Mutter als Helferin	62
63. Die Mutter als Beschützerin	63
64. Die Mutter als Vermittlerin	64
65. Die Mutter als Organisatorin	65
66. Die Mutter als Inspiratorin	66
67. Die Mutter als Motivatorin	67
68. Die Mutter als Unterstützerin	68
69. Die Mutter als Beraterin	69
70. Die Mutter als Helferin	70
71. Die Mutter als Beschützerin	71
72. Die Mutter als Vermittlerin	72
73. Die Mutter als Organisatorin	73
74. Die Mutter als Inspiratorin	74
75. Die Mutter als Motivatorin	75
76. Die Mutter als Unterstützerin	76
77. Die Mutter als Beraterin	77
78. Die Mutter als Helferin	78
79. Die Mutter als Beschützerin	79
80. Die Mutter als Vermittlerin	80
81. Die Mutter als Organisatorin	81
82. Die Mutter als Inspiratorin	82
83. Die Mutter als Motivatorin	83
84. Die Mutter als Unterstützerin	84
85. Die Mutter als Beraterin	85
86. Die Mutter als Helferin	86
87. Die Mutter als Beschützerin	87
88. Die Mutter als Vermittlerin	88
89. Die Mutter als Organisatorin	89
90. Die Mutter als Inspiratorin	90
91. Die Mutter als Motivatorin	91
92. Die Mutter als Unterstützerin	92
93. Die Mutter als Beraterin	93
94. Die Mutter als Helferin	94
95. Die Mutter als Beschützerin	95
96. Die Mutter als Vermittlerin	96
97. Die Mutter als Organisatorin	97
98. Die Mutter als Inspiratorin	98
99. Die Mutter als Motivatorin	99
100. Die Mutter als Unterstützerin	100

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. Einleitung	1
B. Literatur	2
I. Gesetzliche Bestimmungen für die Verarbeitung von aufgeschlossenem Milcheiweiß in Fleischerzeugnissen	2
II. Technologische Bedeutung des Milcheiweißzu- satzes zu Fleischerzeugnissen	3
III. Physikalisch - chemische Eigenschaften des Milcheiweißes	7
1. Allgemeines über Proteine	7
2. Zusammensetzung und immunologische Eigenschaften des Kaseins	8
3. Löslichkeit der Eiweiße	13
a. Allgemeines	13
b. Löslichkeit des Kaseins	14
4. Denaturierung der Eiweiße	15
a. Allgemeines	15
b. Denaturierung des Kaseins	19
IV. Extraktionsverfahren für den Nachweis von Fremdeiweiß in Fleischerzeugnissen	22
1. Allgemeines	22
2. Extraktionsverfahren	24
V. Antigenherstellung, Immunisierung und Serumgewinnung	26
VI. Nachweis von Milcheiweiß in Fleischerzeugnissen	32
1. Chemische, physikalische und biochemische Nachweismethoden	32

	Seite
2. Serologische Untersuchungsmethoden	34
a. Präzipitation	34
α . Agar-Gel-Diffusion	34
β . Immunelektrophorese	35
γ . Fluoreszenzmarkierung der Antikörper für den Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß	36
b. Hämagglutination	37
α . Allgemeines	37
β . Nachweis von Fremdeiweiß mittels der indirekten Hämagglutination	38
γ . Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß mittels des Latextestes	39
C. Eigene Untersuchungen	40
I. Vollanalyse der untersuchten Milcheiweißpräparate	40
1. Material und Methodik	40
a. Bestimmung des Wassergehaltes	40
b. Bestimmung des Fettgehaltes	40
c. Bestimmung der Asche	40
d. Bestimmung des Eiweißgehaltes	40
2. Ergebnisse	42
II. Löslichkeitsverhalten und Gesamteiweißbestimmung der untersuchten Milcheiweißpräparate	45
1. Material und Methodik	45
a. Bestimmung der Löslichkeit	46
b. Bestimmung des Gesamteiweißgehaltes	46
2. Ergebnisse	49

III. Vergleichende Prüfung verschiedener Extraktionsverfahren aus der Literatur an mit aufgeschlossenen Milcheiweiß hergestellten Modellwürsten und Bestimmung der Gesamteiweißgehalte der Extraktionslösungen mittels der Biuretreaktion	54
1. Material und Methodik	54
a. Einfluß der Vorbehandlung des Untersuchungsmaterials auf die Extraktion	55
b. Einfluß des pH-Wertes des Extraktionsmittels auf die Extraktion	55
c. Einfluß der Extraktionszeit und -temperatur verschiedener Extraktionsverfahren auf die Extraktion	56
d. Einfluß der Extraktionsmittelmenge auf die Extraktion	56
2. Ergebnisse	56
IV. Antigenitätsuntersuchungen verschiedener Milcheiweißpräparate mittels Agar-Gel-Diffusion	64
1. Material und Methodik	64
a. Immunisierung nach KLUGE-WILM	65
b. Immunisierung nach HERRMANN	65
c. Durchführung der Agar-Gel-Diffusion	66
2. Ergebnisse	67
V. Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß mittels der indirekten Hämagglutination und Vergleich der serologischen Reaktionsergebnisse mit den Ergebnissen der Gesamteiweißbestimmungen der Extrakte	87
1. Extraktgewinnung	87
2. Durchführung der indirekten Hämagglutination	88
3. Ergebnisse	89
D. Diskussion	93
E. Zusammenfassung	105
F. Literaturverzeichnis	109
Lebenslauf	

A. E I N L E I T U N G

Zu den wertbestimmenden Faktoren eines Fleischerzeugnisses rechnet der Konsument neben einem entsprechenden Genußwert primär vor allem den Fleischanteil. Solange noch keine geeignete Methode zur Verfügung steht, die uns erlaubt, den Fleischeiweißgehalt direkt zu bestimmen, kommt dem serologischen Fremdeiweißnachweis in Fleischerzeugnissen besondere Bedeutung zu, weil bei einem Fremdeiweißzusatz jegliche Beurteilung des Fleisch- und Bindegewebseiweißgehaltes in Frage gestellt wird.

Da die Extraktion der Fremdeiweiße aus Fleischerzeugnissen für die Aussagekraft der serologischen Nachweisreaktionen von entscheidender Bedeutung ist, ist es notwendig, eine standardisierte Extraktionstechnik auszuarbeiten, die bei möglichst geringem Arbeitsaufwand optimale Extraktionsergebnisse zeigt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte eine standardisierte Extraktionsmethode für den serologischen Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß (aME) in erhitzten Fleischerzeugnissen ausgearbeitet und entwickelt werden.

B. L I T E R A T U R

I. Gesetzliche Bestimmungen für die Verarbeitung von aufgeschlossenem Milcheiweiß in Fleischerzeugnissen

Die Zulassung der Verarbeitung von Fremdeiweißen in Fleischerzeugnissen wird in der BRD durch die Fleisch-Verordnung (Bekanntmachung der Neufassung der Fleisch-Verordnung vom 11.Dezember 1969, BGBl I, S.2191) geregelt (19). Nach § 4 (1) Nr.2 dieser VO darf aufgeschlossenes Milcheiweiß (aME) oder Trockenblutplasma zur Herstellung von Brühwurst, tafelfertigem Frühstücksfleisch, Leberwurst, Leberpasten, Lebercremes und Blutwurst sowie tafelfertigen Fleischgerichten wie Gulasch, Frikassee, Fleischklopsen, Fleischpasteten und Rouladen, ausgenommen Leberpasteten, Kochschinken, Fleisch im eigenen Saft, Schmalzfleisch, Corned Beef und Deutsches Corned Beef, in einer Menge von höchstens 2 vom Hundert, bezogen auf die verwendete Fleisch- und Fettmenge dann verwendet werden, wenn die genannten Erzeugnisse durch Erhitzen in luftdicht verschlossenen Packungen oder Behältnissen haltbar gemacht werden. Der Gehalt an aME oder Trockenblutplasma ist durch den Hinweis "mit Milcheiweiß" oder "mit Bluteiweiß" kenntlich zu machen.

Die in § 4 (1) Nr.2 bis 5 der Fleisch-VO benannten Stoffe dürfen Fleischerzeugnissen nur in der Weise zugesetzt werden, "daß sich ihre Verwendung auf jeweils in einer Nummer aufgeführte Stoffe oder Stoffgruppen unter den dort genannten Verwendungsbedingungen beschränkt". So ist z.B. bei Brühwurst die gleichzeitige Verarbeitung von aME und Eiklar nicht zulässig (4).

Nach § 4a (1) Nr.3 darf aME oder Stärke im Fleischbrätanteil von Fleischsalaten, jedoch nur in einer Menge von

jeweils höchstens 2 vom Hundert, bezogen auf die Fleisch- und Fettmenge, verwendet werden. Die für die Verwendung von aME zugelassenen Ausnahmen gelten nur, wenn das aME den in der Anlage zur Fleisch-VO festgesetzten Anforderungen an die Reinheit und Zusammensetzung entspricht. Danach wird aME ausschließlich aus pasteurisierter Milch durch Aufschluß mit Natriumverbindungen der Kohlensäure oder Zitronensäure hergestellt. Das aME darf höchstens 0,5 % Milchzucker, nicht mehr als 2 % petrolätherlösliche Substanzen (bestimmt nach der Methode Weilbull-Stoldt), nicht mehr als 7 % Mineralsalze und nicht mehr als 10 % Wasser enthalten. Alkalische Bestandteile und Verbindungen der Kohlensäure dürfen nicht nachweisbar sein. Der pH-Wert darf nicht über 7,0 sein; der Eiweißgehalt i.T. (berechnet nach der Formel Stickstoff mal 6,37) darf nicht unter 83 % liegen und der Gehalt an wasserunlöslichen Bestandteilen nicht mehr als 10 % betragen. Außerdem gelten die allgemeinen Reinheitskriterien, wonach ein Kilogramm aME nicht mehr als 3 mg Arsen, 10 mg Blei und 25 mg Zink enthalten darf. Kupfer und Zink darf zusammen nicht mehr als 50 mg betragen. Außerdem dürfen keine nachweisbaren Spuren anderer gesundheitlich bedenklicher Verunreinigungen enthalten sein.

II. Technologische Bedeutung des Milcheiweißzusatzes zu Fleischerzeugnissen

Nach KOTTER u. PRÄNDL (67) ist bei der Brühwurstfabrikation die Herauslösung von fibrillärem Muskeleiweiß von entscheidender Bedeutung. Die Emulgiereigenschaften des freigesetzten Eiweißes werden beim Erhitzen durch die Gerinnung des Eiweißes zerstört. Die Fett- und Wasserteilchen werden nun in mehr oder weniger grober Form in dem Gerüst der koagulierten Eiweißkörper eingeschlossen.

Über die Zulassung von aME zur Herstellung von bestimmten Fleischerzeugnissen ist in der amtlichen Begründung des § 4 (1) Nr.2 folgendes ausgeführt:

"Durch Zulassung von aufgeschlossenem Milcheiweiß und Trockenblutplasma wird der Wunsch der Wirtschaft berücksichtigt, die in Abs.1 Nr.2 Buchstabe a bis e aufgeführten Erzeugnisse durch Mitverwendung eines Emulgators in einer ansprechenden und strukturverbesserten Form auf den Markt bringen zu können. Die in emulgierten Form in den Erzeugnissen enthaltenen Fette sind besser verdaulich und für fettempfindliche Personen besser verträglich. Die damit verbundenen ernährungsphysiologischen Vorteile haben in anderen Staaten bereits vor mehreren Jahren zu einer Anwendung von Milcheiweiß bei der Herstellung von Fleischerzeugnissen geführt. Die Regelung erweist sich daher auch zur Vermeidung von unerwünschten Wettbewerbsbeschränkungen im Hinblick auf den bevorstehenden gemeinsamen Markt als notwendig. Die geforderte Deklaration des Zusatzes stellt sicher, daß der Verbraucher in seiner berechtigten Erwartung nicht getäuscht wird".

Die technologische Notwendigkeit von Zusatzstoffen bei der Herstellung von Fleischerzeugnissen begründen Praxis und Wissenschaft (66,72,81,102 u.a.).

Die Lösung der technologischen Probleme bei der Herstellung hochoverhitzter Fleischwaren setzt voraus, daß der Geschmack der Fleischerzeugnisse nicht negativ beeinflusst wird. Folgende Faktoren in Kasein und Kaseinat können Geschmacksabweichungen verursachen: zu hoher Fettgehalt, zu hoher Laktosegehalt sowie zu hoher Wassergehalt (26). Heute bestehen keine Schwierigkeiten mehr, den Milchzucker, der etwa 50 % des Magermilchpulvers einnahm, als ausgesprochenen Ballaststoff aus dem Milcheiweiß zu entfernen, so daß hinsichtlich Geschmack und Haltbarkeit keine Beeinträchtigungen zu befürchten sind (73).

Darüber hinaus ermöglicht der Zusatz von aME die Herstellung strukturverbesserter Erzeugnisse, die durch leichtere Verdaulichkeit der in Fettemulsionen übergeführten Fette beachtliche ernährungsphysiologische Vorteile für den Verbraucher bieten (21,36,61,70).

Bei der Brühwurstherstellung ist neben dem Wasserbindungsvermögen besonders die Fettemulgierung im Brät von Interesse. SCHUT (122) unterscheidet bei der Bewertung der Emulgatoren zwischen dem Emulgiervermögen, der Emulgierkapazität und der Stabilität der entstandenen Emulsionen. Bei Emulsionen wie im Brühwurstbrät handelt es sich um eine Emulgierung von Fett (disperse Phase) in Wasser (kontinuierliche Phase). Um eine stabile Emulsion zu erhalten, muß ein Emulgator drei physikalische und chemische Eigenschaften erfüllen: 1. er muß in dem Zweiphasensystem löslich sein; 2. er muß eine grenzflächen-spannungs-erniedrigende Wirkung besitzen und 3. er muß eine oder mehrere hydrophobe und hydrophile Gruppen enthalten. Die hydrophoben Gruppen dringen ins Fett ein, während sich die hydrophilen Gruppen nach dem Wasser richten. Nach SCHUT (121,122) zeigt das Brühwurstbrät folgenden Aufbau: feinzerkleinerte Fetteilchen als disperse Phase in einer kontinuierlichen Phase (Matrix), bestehend aus feinem fibrillärem Material in einer Kolloidallösung von salz- und wasserlöslichem Eiweiß. In den Grenzflächen zwischen den Fett- und Wasserteilchen bilden sich die Eiweißmembranen, wobei anscheinend zusätzlich Wasser gebunden wird. SCHUT nimmt an, daß sich die Eiweißmoleküle im Grenzflächenbereich teilweise entfalten und die gerichteten polaren Gruppen des Eiweißes extra Wasser zu binden vermögen. Bei der Erhitzung tritt eine Zerstörung der Membranen auf und dem nicht unmittelbar an der Membranbildung beteiligten Eiweiß kommt hauptsächlich eine stabilisierende Rolle zu. Um eine zusätzliche

Konsistenzverbesserung des Bräts zu erreichen, ist die Erhöhung der Menge an emulgierfähigem Eiweiß von größter Bedeutung. Das nicht hitzeokoagulierbare aME mit hohem Emulgiervermögen ist dabei am vorteilhaftesten, da die gebildeten Eiweißmembranen weniger hitzeempfindlich sind.

Deshalb werden nach KOTTER u. Mitarb. (75) für hocherhitzte Brühwürste neben Kutterhilfsmitteln verstärkt Hilfsstoffe eingesetzt, die die fibrilläre Muskeleiweiß in seiner fettemulgierenden, wasserbindenden und z.T. auch strukturbildenden Wirkung entlasten sollen. Nach KOTTER u. TERPLAN (65) besteht der positive technologische Effekt des Milcheiweißes auf das Brät darin, daß durch die Zugabe von aME zum Fett das Fett vor der Zugabe zum Fleisch mit Milcheiweiß emulgiert und somit ein Teil der Muskeleiweißkörper für die Strukturbildung frei wird. Milcheiweiß sollte deshalb bei der Brühwurstfabrikation nicht auf das Fleisch sondern auf den Speck gegeben werden. Muskeleiweiß ist nicht allein in der Lage, Wasser und Fett bei Temperaturen über 75°C ausreichend fest zu fixieren. Es tritt infolge der starken Dehydration eine Strukturbeeinträchtigung auf, so daß Gelee und Fett abgeschieden werden. Der Zusatz von aME, das sich nur indirekt an der Strukturbildung beteiligt - bevorzugt durch Entlastung des Muskeleiweißes - und sich im wesentlichen auf die Wasser- und Fettbindung konzentriert, fördert die Ausbildung einer zusammenhängenden Struktur. aME wirkt also nur emulgierend und wasserbindend; es ist zu keiner zusammenhängenden Koagulation befähigt (72).

Nach PFAFF (102) erweist sich die Milcheiweiß-Fett-Emulsion weitgehend als autoklavenfest. Bei Deformierung durch Druck würden die zu einem Gitterwerk verdichteten Eiweißkörper wie eine bewegliche zusammenhängende Hülle nachgeben, ohne aus dem Verband zu treten. Beim Nach-

lassen der mechanischen Beeinflussung bildet sich wieder die ursprüngliche Kugelform.

Diese Interpretation HOLPERTs (52) ist durch immunhistochemische Untersuchungen von Milcheiweiß gestützt. Den Herstellern von Fleischerzeugnissen sollte es bei der Verarbeitung von aME nicht in erster Linie um den Ersatz von Fleischeiweiß, sondern vielmehr um den technologischen Nutzen, den das Muskeleiweiß in den modernen Herstellungsverfahren oft nicht mehr ohne fremde Hilfe erreichen kann, gehen (78).

III. Physikalisch - chemische Eigenschaften des Milcheiweißes

1. Allgemeines über Proteine

Proteine sind hochmolekulare, organische, Stickstoff enthaltende Verbindungen, die sich aus chemischer Sicht dadurch auszeichnen, daß sie bei der Hydrolyse fast ausschließlich Aminosäuren als Spaltstücke ergeben. Die Aminosäuren sind durch die Aminogruppe der einen mit der Carboxylgruppe der anderen verbunden und können so, aneinandergereiht, lange Ketten bilden (110). Die Proteine sind, wie die Aminosäuren, Ampholyte, d.h. sie können in zweifacher Weise dissoziieren. Im sauren pH-Bereich sind die Eiweißkörper Kationen, im alkalischen Anionen und in einem mittleren pH-Bereich Zwitterionen. Sie bilden also mit starken Säuren und starken Basen Salze, die sauer bzw. basisch reagieren. In wässriger Lösung liegen die Proteine nicht als Neutramoleküle, sondern als innere Salze, richtiger als Zwitterionen vor (40).

Im elektrischen Feld zeigen sie ein charakteristisches Verhalten. Im alkalischen Bereich sind sie negativ geladen und wandern im elektrischen Feld zur Anode, im sauren Bereich positiv und wandern zur Kathode. Im isoelektrischen Bereich wandern die Proteine im elektrischen Feld nicht. Ihr Verhalten entspricht dem eines nach außen hin ungeladen erscheinenden Dipols (7). Als isoelektrischer Punkt (I.P.) eines Eiweißkörpers wird diejenige H-Ionenkonzentration bezeichnet, bei welcher der betreffende Eiweißkörper gleichviel positive und negative Ladungen trägt. Die Lage des I.P. ist für jeden Eiweißstoff charakteristisch. Im I.P. ist die Gesamtladung maximal, die Überschußladung aber Null, während im sauren bzw. alkalischen Bereich die negative bzw. positive Überschußladung maximal, die Gesamtladung aber geringer als im I.P. ist. Beim I.P. werden die kolloidchemischen Eigenschaften der Proteine deutlich: man beobachtet ein Minimum der Löslichkeit bzw. ein Maximum der Aussalzung und Fällung; ein Maximum an Kristallisationsfähigkeit, ein Minimum an Viskosität der löslichen Eiweißkörper und ein Minimum des Quellungsvermögens bei unlöslichen Eiweißkörpern (7). Die Proteinmoleküle sind aus 10^3 und 10^9 Atomen aufgebaut. Sie zeigen im Gegensatz zu den Aminosäuren und Peptiden makromolekulares Verhalten, welches sich durch besondere physikalische Eigenschaften ausdrückt (130).

2. Zusammensetzung und immunologische Eigenschaften des Kaseins

Der Gesamteiweißgehalt der Milch besteht zu 83 % aus Kasein, 13 % aus Albumin und 4 % aus Globulin.

Kasein stellt in getrocknetem Zustand ein weißes, hygroskopisches Pulver ohne Geruch und Geschmack dar und ist in Wasser so gut wie unlöslich. Im Kaseinmolekül sind Kohlenstoff, Wasserstoff, Stickstoff, Sauerstoff, Schwefel und Phosphor enthalten. Der Phosphor liegt im Kasein als Phosphorsäure vor, die durch esterartige Bindungen mit den Aminosäuren des Eiweißes gekoppelt ist. Aus diesem Grunde muß das Kasein als komplexiertes Eiweiß angesehen werden und gehört zu den Phosphoproteiden. Sein Molekulargewicht beträgt etwa 30 000. Die Aminosäuren des Kaseins enthalten einen Teil freier Amino- (basische) und Säuregruppen. Das Kasein ist also ein amphoterer Elektrolyt, der je nach dem als Säure und auch als Base dissoziieren kann. Somit kann Kasein mit Laugen und auch mit Säuren Salze bilden. Es besitzt mehr Carboxyl- als Aminogruppen, daher reagiert Kasein sauer. Kasein löst sich in Mineralsäuren und organischen Säuren (Essig-, Ameisensäure u.a.). Kaseinlösungen sind kolloidal, zähflüssig und schwer filtrierbar. Die Alkalikaseinate ergeben in Wasser durchsichtige oder leicht opaleszierende Lösungen. Das saure Calciumkaseinat ist in Wasser nur wenig löslich, das neutrale löst sich stärker. Dabei entsteht eine trübe milchige Lösung (7,56). Die Kaseine liegen in der Milch als Calciumsalze in fein-disperser Form von kolloidal suspendierten Mizellen vor; zum Unterschied von ihren monomer oder oligomer gelösten Alkalisalzen (118). Diese Partikel werden allgemein als Calcium-Phosphocaseinat oder Calcium-Caseinat-Phosphat bezeichnet (6,58,118). An seinem I.P. bei pH 4,6 - 4,7 wird Kasein aus Magermilch durch Ansäuerung ausgefällt; durch Lab ist Kasein ebenfalls fällbar. Zur Herstellung von aME wird das im Kasein enthaltene Calcium gegen Natrium ausgetauscht; es entsteht Natriumkaseinat, wobei der Phosphorgehalt im wesentlichen erhalten bleibt (106).

Zur Herstellung von aME wird das Sprühtrocknungsverfahren am häufigsten angewendet. Kleine Mengen von Milchprodukten werden durch Walzentrocknung hergestellt (58).

Nach BELITZ u. Mitarb. (6) ist die Entscheidung über die Einheitlichkeit eines isolierten Proteins in vielen Fällen sehr schwer zu treffen. Für die Beurteilung eines Proteins sind folgende Reinheitskriterien heranzuziehen: einheitliches Verhalten in der Ultrazentrifuge und bei der Elektrophorese unter variierenden Bedingungen (pH-Wert und Ionenstärke) sowie einheitliches Verhalten bei chromatographischen Verfahren. Bei biologisch aktiven Proteinen darf sich die spezifische Aktivität nicht ändern.

Die Inhomogenität des säuregefällten Kaseins wurde von MELLANDER (89) bewiesen, der bei der Elektrophorese drei Komponenten α -, β - und γ -Kasein erhielt (100). SCHULTE u. MÜLLER (120) sowie HIPPE u. Mitarb. (50) konnten elektrophoretisch ebenfalls drei Fraktionen im Kasein nachweisen.

Die Zusammensetzung von säuregefälltem Kasein ist ziemlich konstant; bezogen auf Gesamtkasein besteht es aus 75 % α -Kasein, 22 % β -Kasein und 3 % γ -Kasein. BRUNNER u. Mitarb. (9) sowie THOMPSON u. Mitarb. (141) fanden folgende Werte: Gesamtkasein 76 - 86 %, davon 45 - 63 % α -Kasein, 19 - 28 % β -Kasein und 3 - 7 % γ -Kasein (62). Diese drei Fraktionen unterscheiden sich auch in der Aminosäurezusammensetzung. Die α -Fraktion besitzt die höchste Ionenbeweglichkeit und den höchsten Phosphorgehalt (0,99 %), während die β -Fraktion geringere Ionenbeweglichkeit aufweist und nur 0,6 % Phosphor enthält. Der Phosphorgehalt von γ -Kasein beträgt 0,05 % (7,58). Nach PERLMANN (101)

sind im α -Kasein 40 % des Phosphates als Monoester, 40 % als Phosphamid-Diester und 20 % als Pyrophosphat gebunden. Im β -Kasein soll ein beträchtlicher Anteil des Phosphates als Diester vorliegen.

Besonders komplex ist α -Kasein, während β - und γ -Kasein relativ einheitlich sind. α -Kasein zerfällt in die calciumempfindlichen Fraktionen α_{s1} und α_{s2} , die den Hauptbestandteil ausmachen, und in die calciumstabilen Fraktionen κ und λ , welche nach LINDQUIST (86) als Schutzkolloid die Ausflockung der Kasein-Calciumsalze verhindern. Der genetische Polymorphismus der Rindermilchproteine wurde in einem Nomenklaturschema nach THOMPSON u. Mitarb. (141) festgehalten, welches die genetische Kennzeichnung mit einbezieht. Die Subfraktionen des Kaseins, α_{s1} , κ - und β -Kasein, welche D.G.SCHMIDT (116,117) in einem elektrophoretischen Studium untersuchte, kommen in den genetischen Varianten A, B und C vor. Eine Unterscheidungsmöglichkeit der genetischen Kaseinvarianten ist durch die relative Beweglichkeit in der Zonenelektrophorese gegeben.

Von den immunbiologischen Untersuchungsmethoden hat sich für das Studium der Zusammensetzung der Milcheiweiße die Immunelektrophorese bewährt. Das im Elektropherogramm die drei Komponenten α , β und γ zeigende Gesamtkasein bildet in der Immunelektrophorese nur ein Präzipitat (2). AURAND u. Mitarb. (2) schließen daraus, daß nur die α -Fraktion Antikörper bildet, während die β - und γ -Fraktion nicht dazu in der Lage sein sollen. Nach Untersuchungen anderer Autoren (32,34,35) bildet α -Kasein in der Immunelektrophorese bei Reaktion mit dem kompletten Anti-Kuhmilch-Serum jedoch drei Präzipitate, die die antigenanalytische Heterogenität der α -Kaseinfraktion unterstreichen. Nach GÜNTHER (31) sollen im Gegensatz zu den Molkenproteinen

die Kaseine relativ schlechte Antikörperbildner sein.

Nach H.SCHMIDT (115) muß ein Protein über eine determinante Gruppe verfügen, um als Antigen wirken zu können. HÖPNER (51) berichtet, daß zumindest ein "künstliches" Antigen ein Molekulargewicht nicht unter 2.000 aufweisen muß.

Bei aME handelt es sich um verschiedene Proteinfractionen mit unterschiedlicher Molekülgröße und Wanderungsgeschwindigkeit.

Jedes Antigen, das verschiedene antigene Determinanten pro Molekül (multivalent) besitzt, kann eine "Vielheit" von Antikörpern, die mindestens bivalent sind, erzeugen. Fremdeiweiße liegen als komplexe Antigene vor, die durch die Immunisierung eine große Vielheit von Antikörpern induzieren. Werden aus solchen antigenen Komplexen gewisse Fraktionen möglichst rein isoliert, so können diese bei Serumspendern möglicherweise keine Antikörperbildung mehr hervorrufen. Bei diesen Bestandteilen handelt es sich nur noch um determinante Gruppen ohne antigene Träger-Haptene.

Daher sollte immer mit Vollantigenen immunisiert werden.

Die Antigenität ist bei Sojaprotein, Trockenblutplasma und frischem Hühnereiklar sehr hoch, während es bei aME zu einer Abschwächung der antigenen Wirkung kommt. Die weitaus schlechteste Antigenität wurde bei den Gluten-Präparaten festgestellt (48).

TOKITA u. TAKAHASHI (142) berichten, daß die antigenen Eigenschaften des Kaseins durch die Wirkung eines

proteolytischen Enzyms mit pepsinähnlicher Substratspezifität und durch die Mehrfachwirkung proteolytischer Enzyme wie Pepsin und Trypsin beeinflusst werden.

3. Löslichkeit der Eiweiße

a. Allgemeines

Die Löslichkeit eines Stoffes beruht auf der Wechselwirkung zwischen seinen dissoziierenden Gruppen und dem pH-Wert des Lösungsmittels und entspricht der Potentialdifferenz des Stoffes zum Lösungsmittel (16).

Proteine variieren stark in ihrer Wasserlöslichkeit. Manche lösen sich leicht in reinem Wasser, andere brauchen eine bestimmte Konzentration an Salzen, wieder andere sind in Äthanol löslich. Nach JENESS u. PATTON (58) lösen sich Proteine dann in Wasser, wenn ihre Anziehungskraft für Wasser größer ist als die zwischen den Eiweißmolekülen. Die Löslichkeit der Proteine wird durch Temperatur, pH-Wert (Säuren, Basen), Ionenstärke (Salze), Dielektrizitätskonstante (organische Lösungsmittel, dipolare Ionen) sowie Proteinkonzentration beeinflusst (41, 88). Die Eiweißkörper lösen sich grundsätzlich nur in polaren Lösungsmitteln, vor allem also in Wasser und überhaupt nicht in wenig polaren Lösungsmitteln wie Äther, weil für die Löslichkeit der Proteine einerseits die Stärke der Gitterkräfte im festen Zustand, andererseits die Kräfte zwischen den gelösten Molekülen und den Molekülen des Lösungsmittels entscheidend sind. Durch starke Gitterkräfte im festen Zustand zusammengehaltene Eiweißkörper erfordern für ihre Löslichkeit eine starke Affinität zum

Lösungsmittel. Alle polaren Gruppen der Proteine können mit polaren Lösungsmitteln, insbesondere mit Wassermolekülen in Wechselwirkung treten (7). Die Löslichkeit der Proteine zeigt, in Abwesenheit von Salzen, ein Minimum beim I.P., da dann die wechselseitige Anziehung der positiven und negativen Ladungen der benachbarten Moleküle am größten ist. Neutralsalze wirken in kleinen Konzentrationen löslichkeitserhöhend; die Ladung der Proteine wird erhöht und somit ihre Löslichkeit. Dieser Vorgang wird als "Einsalz-Effekt" ("salting-in") bezeichnet. Einwertige Anionen erhöhen die Löslichkeit stärker als mehrwertige Anionen; umgekehrt sind mehrwertige Kationen wirksamer als einwertige. Dagegen setzen Neutralsalze in höheren Konzentrationen die Löslichkeit der Proteine herab. Diese Erscheinung bezeichnet man als "Aussalz-Effekt" ("salting-out"). Aufgrund der Hydratationsneigung anorganischer Ionen wird durch Wasserentzug das Protein aus der Lösung herausgedrängt. Salze mit mehrwertigen Anionen sind wirksamer als solche mit einwertigen, dagegen sind Salze mit mehrwertigen Kationen von geringerer Wirkung als solche mit einwertigen. Ammoniumsulfat eignet sich am besten zum Aussalzen (6,7, 58,88,134).

b. Löslichkeit des Kaseins

Die Phosphoproteide, zu denen das Kasein gehört, lösen sich leicht in Alkalien und werden aus diesen Lösungen durch Säuren wieder ausgefällt. Als amphotere Stoffe sind sie schwerer in stärkeren Säuren löslich, während sie in reinem Wasser unlöslich sind. Die Grenzen der Aussalzbarkeit durch Ammoniumsulfat liegen zwischen 22 und 26 % der Sättigungskonzentration (7). Kaseinnieder-

schläge lassen sich durch vorsichtigen Alkalizusatz bis zu einem pH zwischen 6 und 7 als Alkalisalze in Lösung bringen. Die Auftrennung des Gesamtkaseins in seine einzelnen Komponenten ist nur mit den löslichen Alkalikaseinaten, welche aus den in der Milch vorhandenen Calciumkomplexen von Gesamtkasein hergestellt werden, möglich, da eine Fraktionierung nur mit den löslichen Kaseinaten, nicht aber mit ihren unlöslichen Calciumkomplexen durchgeführt werden kann (118).

Bei α - und β -Kasein hängt die Löslichkeit in erster Linie vom pH-Wert und nur sehr wenig von der Salzkonzentration ab. Weitgehend unlöslich beim I.P., lösen sie sich jedoch mit zunehmender Entfernung des pH nach beiden Seiten sehr leicht. Aufgrund ihres verschiedenen Lösungsverhaltens können sie getrennt werden. So ist α -Kasein bei pH 4,2 und 2°C, β -Kasein bei pH 4,9 und 20°C weniger löslich. γ -Kasein weist in 50 %iger Äthanol-Lösung eine gute Löslichkeit auf (58).

4. Denaturierung der Eiweiße

a. Allgemeines

Eine der charakteristischsten Eigenschaften der Proteine ist die Denaturierung. Sie wird im allgemeinen nicht von der Lösung kovalenter Bindungen begleitet, sondern von Änderungen, die die Sekundär- und Tertiärstruktur betreffen und die komplizierte Faltungs- und Spiralstruktur zerstören. Für die sekundäre oder tertiäre Struktur werden in der Literatur die Ausdrücke Kon-

stellation oder Konformation gebraucht. Somit kann Denaturierung als Änderung der Konstellation oder Konformation des nativen Proteins definiert werden (38). Bei der Denaturierung handelt es sich um eine Trennung der Wasserstoff- und Schwefelbrücken. Aufgrund der Lösung dieser Querverbindungen kommt es zu einer teilweisen Entfaltung der Peptidketten, aber nicht zu einer Lösung der eigentlichen Peptidverbindungen (16). Die mit der Denaturierung verbundene Entfaltung von Peptidketten führt vielfach zu einer "Demaskierung" der reaktiven Gruppen (57). Die im nativen Zustand nicht nachweisbaren Sulfhydryl-, Disulfid- und Imidazolgruppen lassen sich dann analytisch erfassen.

Nach HAUROWITZ (38) handelt es sich bei der Denaturierung um eine Reaktion, die aus zwei oder mehreren Teilreaktionen besteht. In der ersten Phase findet vermutlich eine intramolekulare Umlagerung der Peptidstruktur statt, während in späteren Phasen Polymerisation und vermutlich auch Bildung von Komplexen zwischen dem Eiweißmolekül und den in der Lösung vorhandenen Molekülen des Wassers, der Anionen, Kationen und ungeladenen Molekülen erfolgen. Nach BELITZ u. SCHORMÜLLER (6) ist die Denaturierung bei biologisch aktiven Proteinen im allgemeinen auch mit einem Verlust der Aktivität oder auch Verlust der serologischen Spezifität verbunden. Erst in jüngerer Zeit wird angenommen, daß grundsätzlich jede Denaturierung als umkehrbarer Vorgang gedacht werden kann. Andererseits berichten JENNESS u. PATTON (58) : "wenn das für die Denaturierung verantwortliche Agens entfernt wird, könnte das Molekül bestrebt sein, sich wieder zu falten und zurückzurollen; in der Regel kann es jedoch seine ursprüngliche Struktur nicht wiedererlangen. Es ist somit irreversibel verändert".

PUTNAM (103) sieht in der Denaturierung weniger eine chemische Veränderung als vielmehr eine irreversible physikalische oder intramolekulare Umordnung der nativen Proteinstruktur, die ohne Hydrolyse von kovalenten Bindungen zu einer Änderung der spezifischen räumlichen Konfiguration führe. Folgende physikalischen und chemischen Einwirkungen können dann zu Veränderungen an Proteinen führen: Hitze, mechanische Kräfte, (Einfrieren, Schallwellen, Oberflächenkräfte, Mahlen und Druck), energiereiche Strahlung sowie organische Lösungsmittel, anorganische Elektrolyte, proteolytische Enzyme und Reduktions- oder Oxydationsmittel. Ob diese Faktoren ein Protein lediglich denaturieren oder auch abbauen, hängt nach HAUROWITZ (38) sowie JENESS u. PATTON (58) meist von den Begleitumständen (pH-Wert, Temperatur, Konzentration) und vom Protein ab. Folgende Änderungen der Eigenschaften nativer Proteine durch Denaturierung konnten bisher nachgewiesen werden: verminderte Löslichkeit, verringerte biologische Aktivität, erhöhte Reaktionsfähigkeit von strukturellen Gruppen der Aminosäurereste (SH- und -S-S- Gruppen), die im nativen Protein nicht oder kaum reagieren, Verlust des Kristallisationsvermögens, Veränderung des Molekulargewichtes, Veränderung des Röntgenogramms und der optischen Eigenschaften sowie erhöhte oder verminderte Viskosität und Strömungsdoppelbrechung (17), welche EDSALL u. MEHL (17) aufgrund von Messungen beobachteten.

Allgemeines Kennzeichen dieser Veränderungen ist die Aggregation (Koagulation) (7,58, 143). Hitzekoagulierte Proteine sind in Wasser und verdünnten Salzlösungen unlöslich, dagegen in Säuren und Alkalien, aber auch in gewissen Lösungen hydrotroper Substanzen löslich. Da im denaturierten Zustand im allgemeinen nur die isoelektrischen Proteine unlöslich sind, nicht aber deren

Alkali- oder Säuresalze, ist die Koagulation im Bereich des I.P. durchzuführen.

Die bekannteste Einwirkung, die zur Eiweißdenaturierung führen kann, ist die Erhitzung, wobei das Lösungsmedium von großer Bedeutung ist. Bei zunehmender Wasserstoffionen-Konzentration treten denaturierende Einflüsse auf. Dabei spielen Temperatur und Dauer der Hitzeeinwirkung eine direkte und voneinander abhängige Rolle. So kann unter Umständen trockenes Eiweiß ohne jeden Schaden auf über 100°C erhitzt werden (38).

Der Eintritt einer Denaturierung und Koagulation ist von der Erhitzungsgeschwindigkeit abhängig: die Denaturierungstemperatur liegt um so niedriger, je rascher der Temperaturanstieg erfolgt (11). NEURATH u. Mitarb. (90) betrachten als Hauptmerkmal der Denaturierung intramolekulare Änderungen, die irreversibel sind.

Für den serologischen Nachweis von Proteinen ist der enge Zusammenhang zwischen Denaturierung, Löslichkeit und serologischer Aktivität von Bedeutung. Die bei der Erhitzung in Eiweißkörpern auftretende tiefgreifende Strukturänderung führt nach SINELL (126) bei Überschreitung eines gewissen Schwellenwertes zur serologischen Reaktionsunfähigkeit. In der Literatur werden darüber unterschiedliche Aussagen gemacht. Nach LOEFFLER (87) bildet eine halbe Stunde auf 150°C erhitztes Blut noch Präzipitine, die sowohl das auf 150°C erhitzte als auch das native Material fällten. Nach GRAHAM-SMITH (29) verliert das Serum bereits nach drei Minuten langem Erhitzen auf 64°C seine Reaktionsfähigkeit. Dagegen machen HAUROWITZ (37,38) und LANDSTEINER (83) die nach einer Hitzedenaturierung noch auftretende serologische Spezifität von der Aktivität der determinanten Gruppen abhängig. Inwieweit eine

Zerstörung der determinanten Gruppen als Träger der serologischen Spezifität durch Hitzedenaturierung eintritt, ist noch nicht geklärt.

SINELL (123,124,126) konnte den positiven Nachweis von gekochtem Walfleisch und auf 120°C erhitztem Muskeleiweiß führen. Dagegen gelang W.A.SCHMIDT (112) der Nachweis von völlig durchgekochtem Muskelfleisch nicht. Durch die Denaturierung wird der Antigencharakter des Proteinmoleküls verändert, so daß es mit einem gegen das native Protein gerichteten Antikörper keinen Antigen-Antikörper-Komplex mehr bildet.

Bei höheren Temperaturen kommt es zur Hitzekoagulation, bei der zwei Vorgänge ablaufen: ein Unlöslichwerden des Eiweißes und dessen Ausflockung, die durch Elektrolyte hervorgerufen wird.

Von der Denaturierung trennt JAENICKE (57) das Phänomen der Wärmeaggregation, die als Koagulation sichtbar wird und zu einer Erhöhung des Partikelgewichtes führt, wobei Wärmedenaturierung und Wärmeaggregation einander nicht notwendig bedingen. JENESS u. PATTON (58) bezeichnen die Koagulation als eine Fällung in Form loser, voneinander getrennter Flocken und unterscheiden davon die Gerinnung, bei der die Bildung eines glatten Gels oder gallertigen Gerinnsels entsteht.

b. Denaturierung des Kaseins

Nach BLIX u. Mitarb. (7) scheint die Neigung der Phosphoproteide zur Denaturierung gering zu sein. ROULET u. Mitarb. (108) bezeichnen die Kaseine als "undenaturierbar" oder

sehr hitzestabil. JENESS u. PATTON (58) berichten, daß sich die Kaseine in dem Bereich einer Hitzebehandlung von 60° bis 100°C bis zu fünf Stunden nicht verändern; dagegen gerinnen sie nach den Untersuchungen von G.SCHMIDT (118) beim Erhitzen unter Druck unter Zersetzung. Die Kaseine liegen anscheinend in mehr oder weniger regellos entfalteten Strukturen vor, also nicht in eng gefalteten spezifischen Strukturen, so daß sie für eine Hitzedenaturierung von der Art, wie sie die Serumproteine zeigen, nicht empfänglich sind. Drastische Hitzebehandlung bei 120°C und mehr führen zu einer Verminderung der Löslichkeit des Voll-Kaseins; diese ist jedoch von einer Abspaltung der veresterten Phosphatgruppen, einer Hydrolyse von Peptidbindungen und einem Abbau begleitet, der sich im Auftreten von Nicht-Protein-Stickstoff äußert (58). SINELL (125) konnte nach Erhitzung von mit Kasein zugesetzten Fleischwaren auf 125°C praktisch kein Präzipitat mehr nachweisen, da mit dieser Temperatur der Zustand weitestgehender irreversibler Denaturierung des Kaseins und seiner Abbaustufen erreicht sei. Nach DEGENKOLB u. HINGERLE (15) soll aME in Brühwürsten selbst bei Sterilisationstemperaturen von 117°C nicht zur Koagulation zu bringen sein. Nach LARSON u. ROLLERI (84) lösen die durch die Hitzeeinwirkung entstandenen Veränderungen einen anderen Mechanismus am Kasein als bei den Serumproteinen aus. Die Destabilisierung der Kaseinat-Partikel durch Hitze führe dabei unter Bildung eines dreidimensionalen Netzwerkes zur Aggregation. Es kommt zunächst zu einer Erhöhung der Viskosität und bei stärkerer Hitzeeinwirkung zu einer tatsächlichen Koagulation des Kaseinats mit Trennung des Systems. Um eine Koagulation des Kaseins zu erreichen, sei eine wesentlich höhere Hitzebelastung erforderlich als bei der Denaturierung der Serumproteine. Die Stabilität der Kaseinpartikel wird nicht nur durch Hitzeeinwirkung sondern auch durch Faktoren wie pH-Wert,

Salze und Serumproteine beeinflusst. Wässrige Kaseinlösungen sind gegenüber Hitze außergewöhnlich stabil, aber bereits ein Zusatz sehr kleiner Mengen an Milchserumproteinen ruft eine stärkere Anfälligkeit des Kaseins für die Koagulation hervor. Nach JENESS u. PATTON (58) können die durch Hitzeeinwirkung auf Kasein bewirkten Vorgänge nicht als Denaturierung im herkömmlichen Sinne bezeichnet werden, so daß die Bezeichnung "Hitzenaturierung" beim Kasein vermieden werden sollte. HANSON (33) und WADSWORTH u. HANSON (145) konnten in immunoelektrophoretischen Untersuchungen zeigen, daß trotz Temperatureinwirkungen zwischen 60° und 120°C über 15 Minuten lang, sowie bei Erhitzungen über 15 Sekunden auf 150°C nach AURAND u. Mitarb. (2), Kasein noch Präzipitate bildet, die denen aus nativem Material völlig gleichen. KARTE (60) hat mittels elektrophoretischer Untersuchungen nachweisen können, daß Temperaturen, bei denen 85 - 90 % der Molkenproteine ausflocken, bei α -Kasein nur zum Vorstadium der Ausflockung führen, während β - und γ -Kasein weitgehend nativ bleiben. Selbst bei Sterilisation denaturieren α - und β -Kasein nur partiell, während γ -Kasein noch unverändert bleibt.

Als besonders hitzestabil hat sich auch die κ -Fraktion des Kaseins erwiesen (117). YOSHIMO u. Mitarb. (150) untersuchten das Verhalten der Fraktionen α_s , κ und β unter hoher Temperatureinwirkung und kamen zum Ergebnis, daß die Freisetzung von Nicht-Protein-Stickstoff durch Hitze bei β -Kasein kleiner als bei den anderen beiden Fraktionen ist. Nur in der Phosphorabspaltung zeigen alle drei Fraktionen geringe Unterschiede. Eine Temperatureinwirkung von 140°C führte nach 60 Minuten zur Abspaltung des gesamten Phosphors.

Beim Erhitzen von Gemischen aus Kasein und Molkenproteinen sind Komplexbildungen beschrieben worden, die oberhalb einer bestimmten Temperatur entstehen. So berichtet ROSE (107) über derartige Interaktionen vom β -Lactoglobulin mit Gesamtkasein; ZITTLE u. Mitarb. (151) beobachteten ähnliches mit α - und mit κ -Kasein; HUNZIKER u. TARASSUK (55) mit α -Lactalbumin. Nach ZITTLE u. Mitarb. (151) sind diese Komplexbildungen auf Reaktionen der Sulfhydryl- und Disulfidgruppen zurückzuführen, die unter Hitzeeinwirkung beim α -Lactalbumin und β -Lactoglobulin frei werden und miteinander reagieren.

KARTE (60) beobachtet bei der schrittweisen Denaturierung des α -Kaseins eine zunehmende Trübung der genannten Fraktion, während er einen Trübungszuwachs bei der β - und γ -Fraktion nicht feststellen konnte.

IV. Extraktionsverfahren für den Nachweis von Fremdeiweißen in Fleischerzeugnissen

1. Allgemeines

JÜBERMANN (59) versteht unter "Extrahieren" oder "Extraktion" allgemein ein Verfahren, bei dem aus einem Gemisch eine Substanz oder eine Gruppe von Substanzen durch ein selektiv wirkendes Lösungsmittel "herausgeholt" wird. Eine einfache Extraktion wird angewandt, wenn man aus einer gegebenen Lösung (abgebende Phase) eine Substanz durch ein selektiv wirkendes Lösungsmittel (aufnehmende Phase) herauslösen will. Es findet also ein Stoffaustausch zwischen den beiden Lösungsmittelphasen statt.

Zahlreiche Vorschläge zur Extraktion von Fremdeiweißen aus Fleischerzeugnissen sind bekannt, die teilweise nur auf ein bestimmtes Protein zugeschnitten sind, während andere bei guter Eignung zu arbeitsintensiv oder zu materialaufwendig sind. Im großen und ganzen unterscheiden sich diese Vorschläge meist nur in Einzelheiten: in der Art des Extraktionsmittels und seines pH-Wertes, der Extraktionsmittelmenge, der Extraktionsdauer und -temperatur, der Probenmengen sowie der Vorbehandlung des Untersuchungsgutes (Zerkleinerungsgrad, Lyophilisation und Dialyse).

Für die Bestimmung der Extraktionsmittelmenge ermittelten DEGENKOLB u. HINGERLE (14) zuerst den Wasser- und Fettgehalt des Untersuchungsmaterials. Die zu verwendende Extraktionsmittelmenge errechneten sie mit Hilfe der Formel $4(4a + 1b) - 10 = \text{ml Extraktionsmittel pro } 10 \text{ g}$ Untersuchungsmaterial, wobei a die fettfreie Trockensubstanz und b den Fettgehalt in g darstellen. Damit soll die Fremdeiweißbestimmung auf die Vorschriften der Fleisch-VO abgestellt werden, da das zugesetzte Fremdeiweiß nur auf die Fleisch- und Fettmenge bezogen wird. Um stärker eingeeengte Extrakte zu erhalten, schlagen GERIGK u. KRÜGER (27) vor, in Abänderung der Formel nach DEGENKOLB u. HINGERLE (14), die Menge des Extraktionsmittels nach der Formel $(4a + 1b) 2 = \text{ml Extraktionsmittel pro } 10 \text{ g Untersuchungsmaterial}$ zu errechnen.

HERRMANN (47,77) bezeichnet die Lyophilisation der Extraktion der Fremdeiweiße besonders aus hocherhitztem Wurstmaterial als "Methode der Wahl". Lyophilisierte Proteine stellen ein schwammartiges Netz oder Maschenwerk von feinsten Verteilung dar, wobei die dadurch be-

dingte Vergrößerung der Oberfläche für die Löslichkeit optimale Voraussetzungen schafft (126). DEGENKOLB u. HINGERLE (14), KLUGE-WILM (64) sowie GERIGK u. KRÜGER (27) konnten dagegen in ihren Versuchen durch die Lyophilisation des Untersuchungsmaterials keine Verbesserung der Extraktion feststellen.

Die Schwierigkeit hocherhitztes Material serologisch nachzuweisen, ist nicht, wie früher angenommen, auf mangelnde Reaktionsfähigkeit zurückzuführen, sondern besteht darin, das kochkoagulierte Eiweiß wieder in Lösung zu bringen (47,125,126). ANSON u. MIRSKY (1) versuchten durch schrittweise Alkalisierung hitzedenergiertes Hämoglobin in Lösung zu bringen. W.A. SCHMIDT (111,113) betonte, daß die Extraktion des Antigens ebenso wie die Qualität des verwendeten Antiserum über Erfolg oder Mißerfolg der serologischen Untersuchungen entscheide. Auch UHLENHUTH (144) wies bereits auf die Schwierigkeit hin, aus gekochtem Fleisch gut reagierbare Extrakte für die serologische Fleischdifferenzierung zu gewinnen.

2. Extraktionsverfahren

DEGENKOLB u. HINGERLE (14,15) zerkleinern 100 g Wurstgut (20°C) im Fleischwolf (3 mm Scheibe) und versetzen es mit 5(16a + 4b - 10) ml physiologischer (phys.) Kochsalzlösung und 2,0 ml 1/n NaOH. Nach mehrmaligem Umrühren wird das Gemisch für 2 Stunden bei 50°C im Wasserbad gehalten und anschließend mit dem Ultra-Turrax 30 Sekunden mit 24.000 Umdrehungen homogenisiert, der ph-Wert

mit 1 n NaOH auf 7,5 eingestellt und nochmals 30 Sekunden lang homogenisiert. Das Homogenisat wird 10 Minuten bei 4.000 Umdrehungen zentrifugiert, der Extrakt wird abgesaugt und abgekühlt weiterverwendet.

FROMM (25) extrahiert einen Gewichtsteil homogenisierten Doseninhalts unter sterilen Kautelen mit fünf Gewichtsteilen phys. Kochsalzlösung bei 40°C für 90 Minuten im Wasserbad oder eine Woche im Eisschrank bei Temperaturen von +2° bis +6°C.

SINELL u. KLUGE-WILM (127) versetzen 5 g aus 100 g im Ultra-Turrax zerkleinerten Untersuchungsmaterials mit 5,0 ml kochender phys. Kochsalzlösung, schütteln kräftig und extrahieren 24 Stunden bei Zimmertemperatur; anschließend wird der Extrakt 30 Minuten bei 5.000 Umdrehungen abzentrifugiert.

Nach GÜNTHER (30) werden 5 oder 10 g Material mit 7 bzw. 14 ml Barbitalspuffer im Mörser, auch mit Seesand, gleichmäßig verrieben, mit 3 bzw. 6 ml Puffer nachgespült und nach Vermischen 2 Stunden bei 40°C im Brutschrank stehengelassen. Anschließend wird bei 20.000 g/min 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand durch einen technischen Faltenfilter filtriert.

Nach KOTTER u. HERRMANN (46,76) werden vom Untersuchungsmaterial, das nicht bzw. nicht höher als 75° - 80°C erhitzt worden ist, 100 g fein zerkleinert und mit phys. Kochsalzlösung im Verhältnis 1 : 2 für 48 Stunden zur Extraktion im Kühlschrank bei 0° - 4°C angesetzt. Anschließend wird 15 Minuten bei mindestens 3.000 Umdrehungen zentrifugiert und der opalisierende Überstand als Antigen im Test verwendet. Bei höher als 75° - 80°C erhitztem Material wird das Untersuchungsgut fein zerkleinert und lyophilisiert. Das Lyophilisat wird anschließend

ebenfalls im Verhältnis zum Frischgewicht 1 : 2 mit phys. Kochsalzlösung versetzt und 48 Stunden im Kühlschrank extrahiert.

GERIGK u. KRÜGER (27) haben folgenden Extraktionsvorschlag erarbeitet: 20 g Untersuchungsmaterial aus dem Kern der Probe werden vorzerkleinert; davon werden 10 g lyophilisiert und unmittelbar danach das Gewicht der getrockneten Probe bestimmt. Die Probe wird mit der fünffachen Gewichtsmenge Veronalpuffer versetzt. Das Gemisch wird mit dem Ultra-Turrax 30 Sekunden homogenisiert, mindestens 2 Stunden bei Zimmertemperatur extrahiert und anschließend 10 Minuten bei 2.000 g/min zentrifugiert. Die Fettschicht wird durchstoichen und der Extrakt abgesaugt.

OLSMAN (91,92) benutzte Harnstofflösungen als Extraktionsmittel, allerdings nicht für einen serologischen, sondern für einen elektrophoretischen Fremdeiweißnachweis.

Ebenfalls für den elektrophoretischen Nachweis werden nach FREIMUTH u. KRAUSE (23,24) 5 g Untersuchungsmaterial entweder mit 5 ml Gelpuffer oder mit 10 ml Harnstoff-Borat-Puffer 30 bzw. 15 Minuten mechanisch gerührt. Der Extrakt wird abgekühlt und 30 bzw. 15 Minuten bei 6.000 g/min zentrifugiert.

V. Antigenherstellung, Immunisierung und Serumgewinnung

Die Qualität eines Antiserums wird durch Spezifität und Höhe des homologen Titers bestimmt. Zahlreiche Arbeiten haben sich mit der Herstellung hochwertiger Antiseren

zur Eiweißdifferenzierung beschäftigt. Die Erfahrungen auf dem Gebiet der Immunisierung sind mit Serum- und Muskelproteinen am größten, während die Immunisierung mit Fremdeiweißen erst in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen hat. Bei der Herstellung von Antiseren gegen Fremdeiweiße wird immer wieder auf Arbeitsmethoden zurückgegriffen, die sich bereits bei anderen Fragestellungen bewährt haben. Die Immunisierungsmethoden unterscheiden sich im wesentlichen durch die Art der Verabreichung, die Antigenaufbereitung und die Verwendung von Hilfsstoffen (79).

Injiziert man einem Kaninchen oder einem anderen Serumspender parenteral Serum einer anderen Tierart, so bildet es gegen die artfremden Serumeiweiße Antikörper; daß Antikörper Globuline nach Art der Serumglobuline sind, ist erwiesen (74). Nach H.SCHMIDT (114) werden die Antikörper im Gefäßsystem (Blut, Lymphe) durch Einwirkung von Antigenen auf Globuline gebildet, die dadurch Antikörpereigenschaften erhalten. Im allgemeinen werden Plasmazellen als Globulinbildner auch für die Bildung von Antikörpern verantwortlich gemacht. Nach HAUROWITZ (39) wirkt das Antigen bei der Synthese des Antikörpers im Sinne einer Matrize. Das Antigen greift mittels seiner determinanten Gruppe in die Globulinbildung ein und führt auf diese Weise zur Bildung von Proteinen, die der determinanten Gruppe des Antigens räumlich angepaßt sind ("template theory"). Die Theorie der gegenseitigen räumlichen Anpassung von Antigen und Antikörper wurde später durch kinetische Versuche gestützt (39,98). Da Antikörper erst im freien Zustand im Blut nachweisbar sind, kann über die Geschwindigkeit der Antikörperbildung noch keine sichere Aussage gemacht werden, obwohl die Einflüsse durch Ernährung, Hormone, Begleitreaktionen

bei der Antigeneinverleibung z.B. Röntgenstrahlen, künstliches Fieber usw. als gesichert anzusehen sind (74). Nach HERRMANN (42) ist die Zunahme der Antikörper nur dann proportional zur Antigenmenge, wenn die Antigenmenge gering bleibt. Bei steigender Antigenmenge erreicht der Titer eine Grenze, die auch bei Vermehrung von Antigenmenge und Behandlungsdauer nicht überschritten wird, wohl aber nimmt die Spezifität des Antikörpers ab.

Das geeignetste Tier zur Erzeugung hochwertiger Seren ist das Kaninchen. Die Mehrzahl der Autoren benutzt als Serumspender Bastarde des Stallkaninchens. DEGENKOLB u. HINGERLE (15) sowie CATSIMPOOLAS u. MEYER (10) verwenden rassereine Tiere und zwar "Deutsche Riesen" bzw. "weiße Neuseeländer". Übereinstimmend am günstigsten werden 6 bis 18 Monate alte etwa 3 bis 3,5 Kilo schwere Kaninchen immunologisch beurteilt (44, 71, 74, 126, 144). Lediglich SINELL u. MENTZ (128) sowie KRÜGER u. GROßKLAUS (79) geben eine größere Toleranz mit 3,3 bis 5,8 Kilo an. Grünfütter- und Haferernährung und auch die Immunisierung im Sommer sollen bei der Antiserumgewinnung eine Rolle spielen. Jedoch ist auch bei Fütterung mit Fertigfutter über das ganze Jahr eine gute Antikörperbildung bei Kaninchen zu beobachten (42). Besonders hohe, jedoch weitgehend unspezifische Titer werden bei trächtigen Tieren gefunden. Im allgemeinen wird jedoch den männlichen Tieren der Vorzug gegeben (42, 126), obwohl viele Autoren (79 u.a.) das Geschlecht der Tiere nicht als ausschlaggebend ansehen. Da interkurrente Verluste nicht auszuschließen sind, sollten zur Immunisierung stets mehrere Tiere angesetzt werden (42, 44, 74). Die Verabreichung des Antigens kann auf intracutanem, subcutanem, intramuskulärem, intravenösem und intraperitonealem Wege erfolgen. Größere Mengen Antigens werden subcutan und intraperitoneal verabreicht. Bei der intracutanen, subcutanen, intramuskulären und intraperitonealen Injektion wird das Antigen mehr oder weniger

dauerhaft deponiert, während es bei der intravenösen Technik direkt in die Blutbahn gelangt und somit sofort das gesamte RES zur Bildung von Antikörpern anregt.

KOTTER u. Mitarb. (77), HERRMANN (42) sowie DEGENKOLB u. HINGERLE (14) deponieren große Antigenmengen an verschiedenen Stellen subcutan, WARNECKE u. SAFFLE (146) legen ein intramuskuläres Depot mit kleinen Antigenmengen, FROMM (25) zieht die intravenöse Injektion vor und SINELL u. Mitarb. (127,128) kombinieren die intracutane mit der intravenösen Applikation bei stets kleinen Antigenmengen.

Die Aufteilung der Gesamtdosis in Einzeldosen und deren zeitliche Aufeinanderfolge sind von großer Bedeutung für die Antikörperbildung. KOTTER u. Mitarb. (71) weisen darauf hin, daß die Aufteilung der Gesamtdosis in kleinere Einzeldosen und deren schnelle Verabreichung in kurzen Intervallen (2 Tage Rhythmus) zu besseren Ergebnissen führt. Sie verabreichen dem Versuchstier subcutan die Gesamtdosis in 15 gleichgroßen Einzeldosen im Abstand von je 2 Tagen. Bei einem Injektionsintervall von 5 Tagen wurden schlechtere Ergebnisse erzielt. DEGENKOLB u. HINGERLE (14,15) immunisieren mit der gleichen Technik. CATSIMPOOLAS u. MEYER (10) verteilten die Antigenmenge auf 3 Injektionen im Abstand von 7 Tagen. SINELL u. KLUGE-WILM (127) gehen von 4 Einzeldosen aus. Die erste und kleinste Dosis wird in Freundschem Adjuvans emulgiert. Die Hauptmasse des Antigens folgt in 2 Wochen und verteilt sich auf 3 Injektionen, die an 3 aufeinanderfolgenden Tagen appliziert werden. WARNECKE u. SAFFLE (146) berichten sowohl über die Injektion von 6 Einzeldosen, wobei 4 Injektionen in 2-tägigem Abstand verabreicht werden und nach 10 Tagen weitere 2 Injektionen in 2-tägigem Abstand, als auch von 2 Injektionen an 2 aufeinanderfolgenden Tagen, gefolgt von 22 Tagen Ruhe und weiteren 2 Injektionen mit an-

schließenden weiteren 21 Ruhetagen bis zur Blutentnahme.

In der Lebensmittelüberwachung werden vor allem Antiseren zum Nachweis von erhitztem bzw. autoklaviertem Eiweiß benötigt. Die mit nativem Antigen gewonnenen Antiseren, welche einen hohen aber auch zugleich sehr hohen unspezifischen Titer zeigen, reagieren nur mit Extrakten aus Material, das nicht höher als bis auf 70°C erhitzt worden ist. Bekanntlich sind nur hitzemodifizierte Antigene in der Lage, Antikörper zu induzieren, welche auch noch mit hochehitztem Material in Reaktion treten können. Wieweit diese Hitzeveränderung des Antigens durchgeführt werden soll, ist noch nicht einheitlich festgelegt.

W.A.SCHMIDT (113) verwendete für seine Untersuchungen ein "Hitze-Alkali-Präzipitin", mit dem er sowohl natives als auch bis zu 100°C erhitztes Fleischeiweiß nachweisen konnte. HERRMANN (42,44) benutzte diese Methode für die Antiserumgewinnung gegen Fremdeiweiß in hochehitzten Fleischerzeugnissen und gewinnt Antiseren, die sowohl mit nativen als auch mit bis auf 115°C erhitztem Material reagieren. DEGENKÖLB u. HINGERLE (15) halten eine Erhitzung auf 75°C über 30 Minuten in phys. Kochsalzlösung für erforderlich. Für den Nachweis von bis auf 117°C erhitztem Pflanzeneiweiß muß das Antigen auf 110°C über 30 Minuten erhitzt werden. Nach KLUGE-WILM (64) sowie SINELL u. Mitarb. (125,127) muß für den Nachweis von Milcheiweiß in Fleischwaren das Antigen vor der Verabreichung mindestens auf Kochtemperaturen erhitzt worden sein. Die Milcheiweißpräparate enthalten stets noch geringste Anteile von Molkenproteinen und damit auch Spuren von Serumalbumin.

Diese Verunreinigungen sind bei Verwendung von unerhitztem Milcheiweiß für speziesshomologe Kreuzreaktionen dieser Seren mit Serum- und Muskelproteinen verantwortlich.

Durch die Erhitzung werden die milchunspezifischen Molkenproteine inaktiviert; die immunochemische Polyvalenz des Materials wird beseitigt. Wegen ihrer wesentlich höheren Hitzestabilität verlieren die Kaseinabbauprodukte nicht ihre serologische Aktivität, und die so gewonnenen Seren zeichnen sich durch eine hohe Spezifität aus.

In engem Zusammenhang zur Applikationsart steht die Wahl der zur Immunisierung eingesetzten Hilfsstoffe. In neueren Arbeiten ist besonders Aluminiumhydroxyd und Eisen-III-chlorid sowie das Freundschs Adjuvans in kompletter oder inkompletter Form benutzt worden. KOTTER u. Mitarb. (71), HERRMANN (42) sowie DEGENKOLB u. HINGERLE (15) arbeiten mit dem subcutan am besten anwendbaren Aluminiumhydroxyd in 1,5 bzw. 0,75 % iger Konzentration. CATSIMPOOLAS u. MEYER (10) sowie SINELL u. Mitarb. (127,128) unterstützen die Antikörperbildung mit dem Freundschs Adjuvans. RING (105) sowie KOTTER u. Mitarb. (71) verwenden zur Steigerung der Antikörperbildung neben Hydrolysaten von erhitztem Eiweiß Metallverbindungen wie Aluminiumhydroxyd, Alaun und Eisen-III-chlorid. Der Wirkungsmechanismus der Adjuvantien sei, neben ihrer adsorbativen Fähigkeit, im wesentlichen als eine Kombination von "Depotwirkung und Katalysatorwirkung" anzusehen, wobei die katalytischen Vorgänge dabei sogar überwiegen dürften.

VI. Nachweis vom Milcheiweiß in Fleischerzeugnissen

1. Chemische, physikalische und biochemische Nachweismethoden

Der Nachweis von Milcheiweiß wurde früher indirekt über Calcium, Milchzucker und Kasein geführt. Zusätze an Vollmilch, Magermilch, Frischmilchpulver und Magermilchpulver waren mit diesen Verfahren nachzuweisen. Da aber heute auf dem Fleischsektor im wesentlichen nur noch aME verwendet wird, das praktisch frei von Milchzucker ist, und dessen Calcium-Ionen durch Natrium-Ionen ausgetauscht worden sind, ist die Aussagekraft dieser Verfahren sehr zweifelhaft geworden. Auch der Ausweg, aME über den Phosphoproteidgehalt quantitativ zu bestimmen, weist einen relativ großen Fehlerbereich auf.

Erstmals berichtet FEDER (18) 1909 über den Nachweis von Bindemitteln aus Milch durch die Bestimmung des Calcium-Gehaltes in Fleischprodukten. Auch PELTZER (99) bestimmte den Milcheiweißgehalt in Fleischerzeugnissen über den Calcium-Gehalt.

Die Nachweismethode von LINDNER u. PATSCHKY (85) beruht auf dem Reduktionsvermögen des Milchzuckers aus Magermilchpulver; hierbei reduziert der Milchzucker die zugesetzte Fehling'sche Lösung. Eine Reihe von Methoden befaßt sich mit der physikalisch-chemischen Abtrennung des Kaseins vom Fleischeiweiß. KLUGE (63) trennt das Kasein kolloidchemisch vom Fleischeiweiß. Es kommt zu charakteristischen Veränderungen der Oberflächenspannung und zu einer Ausfällung des Kaseins und des Fleischproteins bei verschiedenen pH-Werten. Die Methode

von KUSCHFELDT u. Mitarb. (80) beruht auf einer spezifischen Isolierung des Kaseins. SCHNECK u. ZIEGLER (119) führen den Kaseinatnachweis durch Fällung mit Essigsäure durch. FLEISCHMANN (20) versucht die Trennung des Fleischeiweißes vom Milcheiweiß mit Hilfe der Papierelektrophorese ohne großen Erfolg. Dagegen verliefen die elektrophoretischen Versuche von BAAL u. LEGET (3), die mit Veronalpuffer durchgeführt wurden, erfolgreich. FREIMUTH u. KRAUSE (22,23) führen den Nachweis von Milcheiweiß mittels der Elektrophorese in Polyacrylamidgel.

Für den quantitativen Nachweis von aME über die Bestimmung des Phosphoprotein-Phosphorgehaltes des Kaseins haben sich in der Praxis vor allem zwei Arbeitsweisen eingeführt: die Methode nach KUTSCHER u. Mitarb. (82) modifiziert von STADELMANN (129) und BRAUN (8) sowie die nach THALACKER (135,137,138,139,140). Dabei ist ein scheinbarer Gehalt von 0,2 bis 0,3 % als Blindwert zu berücksichtigen (20).

KOTTER u. ROLLE (68,69) konnten durch Bestimmung des Glucosamingehaltes nach der modifizierten Elson-Morgan-Methode den Zusatz von Milcheiweiß, Hühnereiweiß und Blutplasma summarisch erfassen.

DE HOOG u. Mitarb. (53,54) sowie THALACKER (136) beschreiben eine Methode zum Nachweis von aME und Sojaprotein in erhitzten Fleischerzeugnissen mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation.

ZWETKOVA (152) berichtet über den Kaseinnachweis mittels einer kombinierten Dünnschicht-Chromatographie mit Sephadex.

2. Serologische Untersuchungsmethoden

Alle bisher bekannten serologischen Verfahren basieren auf spezifischen Serumreaktionen. Derartige Antigen-Antikörper-Reaktionen laufen in zwei Phasen ab. In der ersten Phase kommt es zur Antigen-Antikörper-Komplexbildung, in der zweiten Phase wird dieser Komplex durch Elektrolyte sichtbar gemacht. Das Antigen muß für die meisten serologischen Methoden in gelöstem Zustand vorliegen. In der serologischen Technik unterscheidet man drei Grundformen der Antigen-Antikörper-Reaktion: Agglutination = Verklumpung, Präzipitation = Fällung und Lysis = Auflösung (43). Die gebräuchlichsten serologischen Untersuchungsmethoden für die quantitative Eiweißdifferenzierung sind Präzipitation, Komplementbindungsreaktion und die indirekte Hämagglutination.

a. Präzipitation

Die Präzipitation kann als α -Verfahren, bei der konstante Konzentrationen des Antikörpers auf variable Antigenkonzentrationen einwirken (13), oder als β -Verfahren, wobei variable Antikörperkonzentrationen mit konstanten Antigenkonzentrationen (104) durchgeführt werden, Bei der biologischen Eiweißdifferenzierung ist dem α -Verfahren der Vorzug zu geben.

α . Agar-Gel-Diffusion

OUCHTERLONY (93,94,95,96) sowie OUDIN (97) entwickelten ein Verfahren, bei dem Antigen und Antikörper in einem halbfesten Agar-Agar aufeinander einwirken. Im Falle einer positiven Reaktion wird der klare Agar durch scharf

abgesetzte Präzipitationsbanden getrübt. Man unterscheidet zwischen Einfach- und Doppeldiffusion. Bei der Einfachdiffusion diffundiert entweder nur das Antigen oder nur der Antikörper, während bei der Doppeldiffusion Antigen und Antikörper aufeinander zu diffundieren. Diese Methode wurde inzwischen auch zu einem Objektträgerverfahren ausgebaut, das die Ausführung der Reaktion mit kleinsten Mengen an Antigen und Antikörpern gestattet. Nach HERRMANN (44) ist die Agar-Gel-Diffusion empfindlicher als die Röhrchenpräzipitation, außerdem können auch getrübte Antigenlösungen für den Test verwendet werden. WYLER u. SIEGRIST (148,149) haben mit der Geldiffusion in Wurstwaren noch einen Zusatz von 0,1 % Milcheiweiß und Sojaprotein ab 0,3 % nachweisen können. Allerdings machten die Verfasser keine Angaben über den Erhitzungsgrad des Probenmaterials. HERRMANN u. Mitarb. (45) konnten mit dieser Methode in Brühwürsten zwischen den Milcheiweißkonzentrationen von 1,5, 2,0, 2,5 und 3,0 % grob quantitativ differenzieren. War das Untersuchungsmaterial 30 Minuten auf 80° bis 85° C erhitzt worden, so konnte nur zwischen den Konzentrationen 1,0, 2,0 und 3,0 % unterschieden werden, und bei Erhitzungen auf 90° bis 95° C konnten erst Konzentrationen ab 3,0 % erfaßt werden. Bei noch höheren Temperaturen konnte kein positiver Nachweis mehr geführt werden. DEGENKOLB u. HINGERLE (14,15) entwickelten einen zeit- und materialsparenden, quantitativen Fremdeiweißnachweis auf der Basis der Präzipitation, den sie als "abgestuften Serotest" bezeichneten und der auf einer quantitativen Präzipitatzmessung beruht.

β. Immunelektrophorese

Eine Kombination der Agar-Gel-Diffusion mit der Elektrophorese stellt die von GRABAR u. WILLIAMS (28) ausgearbeitete

Methode der Immunelektrophorese dar, die von SCHEIDEGGER (109) als Mikromethode variiert wurde. Das Protein wird in einem Agar-Gel zunächst elektrophoretisch aufgetrennt. Danach wird Immuns serum so in den Agar-Gel gebracht, daß es senkrecht zur elektrophoretischen Wanderungsachse diffundieren kann. Durch die Diffusion treffen im Agar-Gel Antigen und Antikörper aufeinander. WADSWORTH u. HANSON (145) änderten die Originalmethode und erweiterten die Technik zur sog. "komparativen Immunelektrophorese". Dadurch konnten sie den Nachweis von Antigenen und Antikörpern bereits in sehr niedrigen Konzentrationen führen.

HANSON (33) konnte mit dieser Methode einen Trockenmilchzusatz von 0,1 % im Untersuchungsmaterial nachweisen. HERRMANN u. KOTTER (43) halten bestenfalls eine "semi-quantitative" Aussage mittels der Immunelektrophorese für den Nachweis von Fremdeiweißen in erhitzten Fleischerzeugnissen für möglich.

KLUGE-WILM (64) konnte mit Hilfe der Immunelektrophorese rohe und gekochte Gervitalösungen in Konzentrationen bis 0,01 % bzw. autoklavierte Gervitalösungen bis 0,025 % differenzieren, in Modellbrühwürsten konnte sie einen Milcheiweißzusatz von 0,25 bis 4 % nachweisen, dagegen konnte in hochoerhitzten Fleischerzeugnissen nur der qualitative Milcheiweißnachweis eindeutig geführt werden. Die quantitative Auswertung war nur innerhalb eines recht weiten Streubereichs möglich.

γ. Fluoreszenzmarkierung der Antikörper für den Nachweis von aME

Durch die von COONS u. KAPLAN (12) entwickelte Methode der Markierung von Antikörpern mit fluoreszierenden Farbstoffen lassen sich Antigen-Antikörper-Komplexe unmittel-

bar optisch nachweisen. Zum Unterschied zu den anderen Präzipitationsreaktionen wirkt hierbei der markierte Antikörper nicht auf ein gelöstes Antigen, sondern auf ein im Gewebe festverankertes Antigen. Die fluoreszierenden Antikörper werden vom homologen Antigen fixiert. Alle nicht gebundenen Antikörper können ausgewaschen werden. Wo Antigen-Antikörper-Komplexe gebildet worden sind, lassen sich diese fluoreszenzmikroskopisch nachweisen. HOLPERT (52) sowie HERRMANN u. Mitarb. (45) haben aME mit Hilfe fluoreszierender Antikörper in Fleischwaren nachgewiesen. Der Nachweis kann jedoch mit dieser Methode nur qualitativ geführt werden.

b. Hämagglutination

α. Allgemeines

In den vergangenen Jahren hat die Hämagglutinationsreaktion besonders in der Bakteriologie und Virologie immer größere Bedeutung erlangt. Im Gegensatz zur direkten Hämagglutination, bei der Erythrozyten durch direkte Einwirkung eines mikrobiellen Antigens verklumpt werden, wirken bei der indirekten Hämagglutination Immunsereen auf Erythrozyten, an die homologe Antigene adsorbiert worden sind.

Nach H. SCHMIDT (114) besteht die Eigenart dieser Reaktion darin, daß die Antikörper nicht mit einem Antigen reagieren, das primär den roten Blutkörperchen zugeordnet ist, sondern mit einem solchen, das in einem der eigentlichen Reaktion vorausgehenden Vorgang adsorbtiv an die Blutzellenoberfläche gebunden ist, so daß die Erythrozyten die Antigen-Antikörper-Reaktion gleichsam nur als Indikator sichtbar machen.

Die Empfindlichkeit dieser Methode soll nach den Angaben von STAVITSKY (131,132) die Präzipitation um das 10-fache übersteigen.

WUNDERLY (147) begründet die hohe Empfindlichkeit damit, daß die sichtbare Präzipitation durch die Größe der Partikel limitiert ist und daß aus diesem Grunde die Empfindlichkeitsgrenze der Hämagglutination wesentlich höher liegt, nämlich bei 0,1 bis 0,2 μg Eiweiß-Stickstoff gegenüber 3 bis 10 μg bei der Präzipitation.

β. Nachweis von Fremdeiweiß mittels der indirekten Hämagglutination

HERRMANN (46) konnte in Anlehnung an die Untersuchungen von BOYDEN mit einer modifizierten indirekten Hämagglutination Milcheiweißzusätze ab einer Konzentration von 0,1 % in bis auf 115°C erhitztem Material quantitativ spezifisch erfassen. Beim Vergleich der Immunelektrophorese mit der indirekten Hämagglutination für den quantitativen Nachweis von aME in hocheerhitzten Fleischwaren konnte KLUGE-WILM (64) die Ergebnisse von HERRMANN (46,47) sowie KOTTER, HERRMANN u. CORSICO (77) nicht bestätigen. Sie berichtet dagegen von guten Ergebnissen mit der Immunelektrophorese.

KOTTER, HERRMANN u. CORSICO (77) empfehlen die indirekte Hämagglutination vor allem für den quantitativen Nachweis von Fremdeiweißen in Fleischwaren. Nach ihren Erfahrungen handelt es sich um eine besonders empfindliche und spezifische Nachweismethode. DEGENKOLB u. HINGERLE (14,15) halten den Aufwand der indirekten Hämagglutination in der Lebensmitteluntersuchung auf breiter Ebene für nicht gerechtfertigt und verwenden diese Nachweismethode nur

in "strittigen Einzelfällen".

HERRMANN u. MERKLE (49) führten Untersuchungen zur Standardisierung und Konservierung der sensibilisierten Hammelerythrozyten für die indirekte Hämagglutination durch. Für die Konservierung der mit Tannin vorbehandelten Erythrozyten wurde eine 3 % ige Formalinlösung und für die Sensibilisierung der formalinisierten Erythrozyten wurde von aME eine 0,05 % ige Lösung verwendet. Die Haltbarkeit der formalinisierten und sensibilisierten Hammelerythrozyten (FSE) für aME liegt bei 17 Monaten ohne Titerverlust. Wurden tanninbehandelte, formalinisierte Erythrozyten erst nach 3-monatiger Lagerung bei -20°C sensibilisiert, so blieb der Titer für die Milcheiweißpräparationen über 18 Monate konstant.

γ . Nachweis von aME mittels des Latextestes

FROMM (25) führte den Nachweis von aME in Fleischkonserven mittels des Latextestes, der im Prinzip in der Adsorption von Kunststoffpartikeln bekannter Größe und Menge mit löslichem Antigen besteht, vergleichbar mit der Sensibilisierung der Hammelerythrozyten.

FROMM (25) konnte mit Hilfe des Latextestes aME in 17 bis 30 Minuten bis auf 117° und 121°C erhitzten Fleischerzeugnissen qualitativ und quantitativ in Konzentrationen ab 0,4 % erfassen. STUTZ-BAASCH (133) konnte dagegen mittels sensibilisierter Latexpartikel aME in Fleischerzeugnissen nur qualitativ nachweisen.

C. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

I. Vollanalyse der untersuchten Milcheiweißpräparate

1. Material und Methodik

22 Milcheiweißpräparate aus verschiedenen Ländern, hergestellt nach dem Walz- oder Sprühtrocknungsverfahren (Tab. 1) wurden chemisch analysiert.

a) Bestimmung des Wassergehaltes

Die Bestimmung des Wassergehaltes erfolgte durch thermische Austreibung des Wassers im Trockenschrank bei $104^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ und Bestimmung des dadurch bedingten Gewichtsverlustes.

b) Bestimmung des Fettgehaltes

Für die Fettbestimmung wurde das Material 6 Stunden mit Petroläther im Soxhlet extrahiert.

c) Bestimmung der Asche

Die Präparate wurden im elektrischen Muffelofen bei 300°C vorgetrocknet und bei 600°C bis zur vollständigen Verbrennung der organischen Bestandteile 24 Stunden geglüht. Aus der Gewichts Differenz, vor und nach der Veraschung, bestimmt sich der Aschegehalt.

d) Bestimmung des Eiweißgehaltes

Die Ermittlung des Proteinanteils beruht auf der Bestimmung des Stickstoffes nach Kjeldahl durch Aufschluß mit kon-

Tab. 1

Verwendete Präparate

Marke od. Name	Abkürzg.	Muster aus	Einzelheiten	hergestellt aus
1. Rovita FN 5	FN5N	Holland	Walz Na-Kaseinat u. Dickungsmittel	
2. EM 6 (D.M.V.)	EM-6	D.M.V.-Lab. Holland	Walz Na-Kaseinat	
3. EM-HV (D.M.V.)	EM-HV	D.M.V.-Lab. Holland	— " —	
4. Na-Kasein. LE	LE	D.M.V.-Lab. Holland	— " —	Lab-Kasein
5. Na-Kasein. FR	FR	D.M.V.-Lab. Holland	— " —	franz. Kasein
6. Na-Kasein. RM	RM	D.M.V.-Lab. Holland	— " —	ungekochter, nicht erhitzter Milch
7. Na-Kasein. HM	HM	D.M.V.-Lab. Holland	— " —	hocherhitzter Milch
8. Servita S	GS	Belgien	— " —	
9. Vitessa	V	Belgien	— " —	
10. Haverø	H	Frankreich	— " —	
11. Lidano	L	Dänemark	— " —	
12. Scottish Milk Board	SMB	England	Sprüh Na-Kaseinat	
13. Mavar	M	Finnland	Sprüh Produkt, Mischung von Na- Kas. u. Ca-Kas.	
14. Sancor	SA	Argentinien	Sprüh Na-Kaseinat	
15. Canada	Ca	Canada	— " —	
16. Na-Kaseinat	P	Griechenland	— " —	
17. Dena	D	Deutschland	— " —	
18. Rovita FN 5	FN5D	Deutschland	wie Präp. 1, ohne Dickungsmittel	
19. Gervais S	S	Deutschland	Walz Na-Kaseinat	
20. Gervais SK	SK	Deutschland	— " —	
21. Gervais N	N	Deutschland	— " —	
22. Gervais Na-K	Na-K	Deutschland	— " —	

zentrierter Schwefelsäure unter Katalysatorzusatz (Selenreaktionsgemisch nach Wieninger). Da das stickstoffärmere aME vom Normalgehalt an Stickstoff (16 %) anderer Proteine abweicht, wurde mit dem Umrechnungsfaktor 6,37 gerechnet.

Der Eiweißgehalt der Proben wurde nach folgender Formel berechnet:

$$P = \frac{(Y-Z) \times Q \times V \times 100}{(L-N)} \times 6,37$$

wobei

P = Proteingehalt in Gew.-%

Y = Menge der vorgelegten 0,1 n Schwefelsäure in ml

Z = Menge der zurücktitrierten freien Schwefelsäure in ml

Q = Äquivalenzfaktor (1 ml vom Ammoniak gebundene 0,1 n H_2SO_4 entspricht 0,0014 g N)

V = Verdünnungsfaktor (in diesen Untersuchungen 20)

(L-N) = Eingewogene Substanzmenge.

Von jeder Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt und das Mittel errechnet.

2. Ergebnisse

Die Ergebnisse der chemischen Vollanalyse sind in Tab. 2 zusammengefaßt. Bei aME, das keine organischen Zusätze wie Kohlenhydrate, Dickungsmittel und keine Nichteiweißstickstoff-Substanzen enthält, muß die Summe der vier Hauptbestandteile (Rohprotein, Fett, Wasser, Asche) $100 \% \pm 0,5 \%$ betragen. Da einige Präparate die Summe von $100 \% \pm 0,5 \%$ nicht erreichen, muß vermutet werden, daß einige Substanzen nicht durch die Vollanalyse erfaßt werden. Dabei kann es sich sowohl um einen erhöhten

Tab. 2

Vollanalyse der Milcheiweißpräparate

Präp.	Wasser in %	Fett in %	Asche in %	Rohprotein in %	insgesamt in %	O N F in %
FN5N	7,38	0,12	6,09	81,81	95,14	86,43
EM-6	6,96	0,06	4,27	87,78	99,07	88,71
EM-HV	6,49	0,03	4,69	87,88	99,09	88,81
LE	7,61	0,03	3,43	89,28	100,35	88,93
FR	7,39	0,18	3,56	87,99	99,12	88,88
RM	6,43	0,09	3,45	89,53	99,50	90,04
HM	6,98	0,16	4,31	88,17	99,62	88,56
GS	6,54	0,17	5,02	87,74	99,47	88,27
V	7,04	0,23	4,39	84,40	96,06	88,35
H	8,60	0,05	5,66	85,44	99,75	85,69
L	6,19	0,12	5,35	87,58	99,24	88,34
SMB	9,71	0,04	4,31	86,0	100,06	85,94
M	7,0	0,06	6,53	82,75	96,34	86,41
SA	7,58	0,04	6,77	85,74	100,13	85,61
Ca	7,83	0,01	4,0	88,13	99,97	88,16
P	8,83	0,17	5,46	85,80	100,26	85,56
D	7,92	0,23	6,36	83,11	97,62	85,50
FN5D	6,59	0,11	4,41	88,79	99,90	88,90
S	7,80	0,12	5,07	86,53	99,52	87,02
SK	7,98	0,16	9,55	81,90	99,59	82,32
N	8,58	0,14	5,33	86,28	100,33	85,96
Na-K	7,69	0,20	4,88	86,60	99,37	87,24

Milchzuckergehalt, den der Gesetzgeber zwar auf nicht mehr als 0,5 % in aME begrenzt, als auch um andere Zusätze, wobei hauptsächlich an Dickungsmittel und Ascorbinsäure gedacht werden muß. Beim Präparat FN 5 N wird sogar vom Hersteller der Dickungsmittelzusatz deklariert. Aber auch die Präparate V, M und D dürften durch die Vollanalyse nicht erfaßbare Zusätze wie Dickungsmittel und Kohlenhydrate enthalten. Präparat SK enthält sehr viel Mineralsalze. Die Präparate FN 5 N und SK liegen geringfügig unter dem gesetzlich geforderten Mindesteiweißgehalt. Alle anderen Präparate entsprechen den Bestimmungen des Gesetzgebers für den Mindesteiweißgehalt von aME. Da die Höhe des Proteingehaltes wertbestimmend für die Qualität eines aME-Präparates ist, ist Präparat FN 5 N mit einem Rohproteingehalt von 81,81 % von geringerer Qualität als Präparat RM mit einem Rohproteingehalt von 89,53 %.

II. Löslichkeitsverhalten und Gesamteiweißbestimmung der untersuchten Milcheiweißpräparate

Für die Anwendung serologischer Arbeitsmethoden zum Nachweis von aME ist die Extrahierbarkeit, also das Vorliegen einer ausreichenden Menge an gelöstem aME im Extrakt aus hoherhitzten Fleischerzeugnissen von ausschlaggebender Bedeutung. Deshalb mußte geprüft werden, inwieweit sich die im Handel befindlichen verschiedenen Milcheiweißpräparate in ihrem Löslichkeitsverhalten nach unterschiedlicher Temperatureinwirkung und bei Verwendung verschiedener Lösungsmittel unterscheiden. Da bei der Verwendung von aME zur Herstellung von Fleischerzeugnissen Sterilisationstemperaturen Anwendung finden, mußte auch geklärt werden, ab welchen Temperaturen eine signifikante Abnahme des Löslichkeitsvermögens der verschiedenen Präparate auftritt. Bei der Produktion von hoherhitzten Fleischwaren sollten Milcheiweißpräparate verwendet werden, die noch bei hohen Temperaturen löslich sind, d.h. hohe Temperaturen ohne Denaturierung überstehen, um noch emulgierend wirken zu können.

1. Material und Methodik

Von 22 Milcheiweißpräparaten (Tab.1) wurden 2 % ige Milcheiweißlösungen hergestellt. Als Lösungsmittel diente Aqua dest. oder phys. Kochsalzlösung (pH 7,2). Die Präparate wurden 20 Minuten auf dem Magnetrührer gerührt. Das Löslichkeitsverhalten sowie der Gesamtproteingehalt der Eiweißlösungen wurde bei nicht erhitzten und 30 Minuten auf 56°, 70°, 80°, 90°, 100°, 115° und 125°C erhitzten Lösungen bestimmt.

a) Bestimmung der Löslichkeit

Für die Bestimmung der Löslichkeit der zur Untersuchung anstehenden Präparate von aME wurden die Lösungen nach dem Rühren 15 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und für die Gesamteiweißbestimmung verwendet. Der Eiweißrückstand wurde 12 Stunden im Trockenschrank bei 54°C getrocknet und anschließend bestimmt. Vom Gewicht des Rückstandes wurde auf die prozentuale Löslichkeit des Milcheiweißes im Lösungsmittel geschlossen.

Die Ergebnisse sind in den Tab. 3 und 4 zusammengefaßt.

b) Bestimmung des Gesamteiweißgehaltes

Der Gesamteiweißgehalt der verschiedenen Lösungen wurde mittels der Biuretreaktion in Anlehnung an die von BEISENHERZ u. Mitarb. (5) beschriebenen Methode wie folgt bestimmt:

1 ml der Eiweißlösung wird in einem auf 10 ml graduierten Zentrifugenglas unter Umrühren mit 0,2 ml einer 50 % igen Trichloressigsäure versetzt. Der Eiweißniederschlag wird 15 Minuten bei 3000 U/min abzentrifugiert und die überstehende Lösung sorgfältig entfernt. Der Niederschlag wird in etwa 5 ml Aqua dest. aufgewirbelt, mit 5 ml Biuretreagens vermischt und auf 10 ml mit Aqua dest. aufgefüllt. Nach 30 Minuten wird die spektrometrische Bestimmung der Extinktion in einen Beckmann-Apparat bei einer Wellenlänge von 546 nm und einer Schichtlänge von 1 cm gegen einen Blindwert der Mischung von 5 ml Aqua dest. und 5 ml Biuretreagens durchgeführt. Die Berechnung der Eiweißkonzentration erfolgt nach folgender Gleichung:

gemessene Extinktion $\times 34 = \text{mg Protein pro Testansatz.}$

Präp.	nicht erhitzt		56°C		70°C		80°C		90°C		100°C		115°C		125°C	
	a.2% bezogen	a.100% bezogen	a.2% bezogen	a.100% bezogen	a.2% bezogen	a.100% bezogen	a.2% bezogen	a.100% bezogen	a.2% bezogen	a.100% bezogen	a.2% bezogen	a.100% bezogen	a.2% bezogen	a.100% bezogen	a.2% bezogen	a.100% bezogen
FN5N	1,92	96,0	1,96	97,8	1,95	97,6	1,96	97,9	1,96	98,1	1,95	97,7	1,93	96,6	1,84	92,2
EM-6	1,96	98,1	1,99	99,6	1,97	98,6	1,98	98,9	1,99	99,3	1,98	98,8	1,87	93,5	1,76	88,1
EM-III	1,95	97,4	1,98	99,2	1,98	99,1	1,98	98,8	1,99	99,8	1,96	98,1	1,83	91,6	1,71	85,7
LE	1,94	97,1	1,97	98,7	1,97	98,3	1,96	97,9	1,98	98,8	1,93	96,7	1,66	83,0	1,60	79,8
FR	1,83	91,7	1,97	98,3	1,95	97,4	1,95	97,6	1,98	99,2	1,96	98,0	1,70	84,8	1,58	79,2
HM	1,96	98,2	1,99	99,8	1,98	98,8	1,98	99,0	1,99	99,5	1,97	98,4	1,75	87,7	1,57	78,5
HM	1,43	71,5	1,47	73,3	1,48	74,1	1,52	75,8	1,56	77,9	1,55	77,7	1,59	79,5	1,59	79,7
GS	1,83	91,4	1,96	98,1	1,96	98,2	1,96	98,1	1,97	98,4	1,97	98,4	1,66	83,0	1,49	74,6
V	1,96	97,8	1,96	97,9	1,96	98,0	1,96	97,8	1,97	98,4	1,96	98,2	1,77	88,7	1,60	79,8
I	1,68	83,8	1,82	91,1	1,85	92,6	1,84	92,2	1,89	94,7	1,92	96,1	1,81	90,7	1,80	89,9
L	1,91	95,7	1,89	94,3	1,89	94,7	1,88	94,1	1,86	93,0	1,84	92,2	1,65	82,4	1,58	78,8
EMB	1,99	99,4	1,99	99,5	1,98	99,2	1,99	99,3	1,99	99,6	1,94	97,0	1,85	92,5	1,74	86,9
M	1,0	50,1	1,12	56,0	1,15	57,4	1,18	59,0	1,20	60,0	1,19	59,4	1,46	72,9	1,49	74,6
SA	1,99	99,5	1,98	99,0	1,99	99,3	1,99	99,3	1,98	99,2	1,98	99,2	1,88	93,9	1,75	87,3
Ca	1,97	98,7	1,98	99,0	1,99	99,3	1,98	98,9	1,98	99,0	1,99	99,3	1,79	89,7	1,67	83,5
D	1,49	74,6	1,7	85,2	1,73	86,7	1,74	87,2	1,74	86,9	1,74	87,2	1,73	86,4	1,64	82,2
FN5D	1,96	98,0	1,98	99,0	1,97	98,6	1,97	98,7	1,97	98,6	1,97	98,6	1,89	94,6	1,8	89,8
P	1,94	97,2	1,94	97,0	1,96	98,2	1,97	98,5	1,97	98,6	1,98	99,0	1,97	98,5	1,93	96,5
C	1,87	93,5	1,93	96,8	1,96	98,1	1,95	97,6	1,96	97,8	1,95	97,6	1,95	97,5	1,88	94,0
SK	0,96	48,0	1,49	74,5	1,52	76,0	1,68	84,0	1,77	88,3	1,8	90,1	1,94	96,8	1,92	95,8
P	1,7	85,0	1,89	94,5	1,93	96,3	1,94	97,0	1,94	97,0	1,93	96,6	1,95	97,4	1,87	93,4
HM-K	1,92	96,0	1,92	96,0	1,93	96,7	1,94	97,1	1,94	97,0	1,93	96,7	1,96	97,8	1,84	92,0

Prüf.-	nicht erhitzt		56°C		70°C		80°C		90°C		100°C		115°C		125°C	
	a. 2% bezogen	a. 100% bezogen	a. 2% bezogen	a. 100% bezogen	a. 2% bezogen	a. 100% bezogen	a. 2% bezogen	a. 100% bezogen	a. 2% bezogen	a. 100% bezogen	a. 2% bezogen	a. 100% bezogen	a. 2% bezogen	a. 100% bezogen	a. 2% bezogen	a. 100% bezogen
FN5N	1,84	91,9	1,93	96,4	1,73	86,5	1,97	98,5	1,94	97,1	1,78	89,0	1,8	90,2	1,79	89,7
FM-6	1,97	98,3	1,98	99,0	1,97	98,5	1,96	98,1	1,96	97,9	1,97	98,7	1,97	98,7	1,93	96,5
FM-IV	1,7	84,8	1,97	98,5	1,96	98,0	1,96	98,2	1,94	97,2	1,92	96,2	1,37	68,6	1,22	61,0
LE	1,93	96,5	1,96	98,1	1,96	98,1	1,97	98,4	1,99	99,3	1,95	97,7	1,63	81,5	1,15	57,5
FR	1,8	89,9	1,95	97,5	1,96	97,8	1,97	98,4	1,99	99,8	1,96	98,2	1,95	97,6	1,92	96,1
RM	1,94	97,1	1,99	99,6	1,98	98,8	1,99	99,5	1,99	99,3	1,98	99,1	1,97	98,5	1,72	86,0
IM	1,35	67,6	1,43	71,3	1,4	70,0	1,32	66,1	1,32	65,9	1,33	66,4	0,86	43,0	0,96	48,0
CS	1,79	89,5	1,93	96,7	1,92	96,2	1,89	94,7	1,89	94,6	1,88	94,1	1,47	73,5	1,34	66,8
V	1,94	97,2	1,93	96,7	1,96	97,8	1,96	97,9	1,96	98,0	1,96	97,8	1,78	92,7	1,73	86,3
H	1,45	72,3	1,77	88,7	1,81	90,4	1,86	93,0	1,88	94,0	1,92	96,1	1,83	88,8	1,68	84,0
L	1,92	95,9	1,94	96,8	1,94	96,8	1,93	96,3	1,93	96,7	1,9	95,0	1,23	61,3	1,11	55,7
SMB	1,98	99,2	1,97	98,5	1,99	99,6	1,98	99,2	1,98	98,8	1,99	99,4	1,98	99,2	1,87	93,4
M	0,81	40,6	0,8	40,0	0,85	42,3	0,75	37,3	0,67	33,3	0,57	28,4	0,57	28,6	0,77	38,6
Ca	1,99	99,6	1,98	98,8	1,98	99,1	1,97	98,5	1,97	98,5	1,96	98,1	1,95	97,5	1,95	97,7
Ca	1,99	99,5	1,98	99,0	1,98	99,0	1,97	98,7	1,97	98,7	1,97	98,6	1,97	98,4	1,88	94,0
D	1,36	67,8	1,65	82,6	1,65	82,7	1,61	80,4	1,54	77,2	1,5	74,9	1,21	60,5	1,14	56,9
FN5D	1,98	98,9	1,96	97,8	1,76	87,8	1,74	87,1	1,78	88,8	1,84	92,0	1,86	93,0	1,89	94,3
P	1,9	95,0	1,88	94,2	1,88	94,0	1,86	93,2	1,88	93,9	1,76	88,2	1,69	94,8	1,38	69,0
S	1,82	91,0	1,88	94,0	1,77	88,5	1,76	88,0	1,7	84,8	1,69	84,6	1,76	88,2	1,74	87,2
SK	0,84	42,0	0,88	44,0	1,61	80,7	1,64	82,0	1,69	86,3	1,76	87,8	1,93	96,6	1,58	79,0
N	1,7	85,2	1,86	93,0	1,91	95,4	1,89	94,6	1,9	95,0	1,89	94,7	1,93	96,6	1,88	94,0
Na-K	1,9	95,0	1,9	95,0	1,92	95,8	1,93	96,6	1,93	96,6	1,92	95,8	1,93	96,3	1,93	96,4

Zur Entfernung der die Messung beeinflussenden Trübungen wurde dem Biuretansatz nach der ersten Messung K C N in Mengen bis zu 30 mg zugesetzt. Nach der vollständigen Entfärbung des Biuretkomplexes wird die Extinktion des farblosen Testansatzes erneut gemessen. Aus der Differenz der beiden Messungen berechnet sich ebenfalls die Protein-Konzentration.

Für jede Bestimmung wurden drei Paralleluntersuchungen angesetzt und davon die Mittelwerte ermittelt.

Die Ergebnisse der Gesamteiweißbestimmung sind in den Tab. 5 und 6 zusammengefaßt.

2. Ergebnisse

Beim Vergleich zwischen den Lösungsmitteln phys. Kochsalzlösung und Aqua dest. zeigte sich, daß die Mehrzahl der Präparate in Aqua dest. eine bessere Löslichkeit aufwiesen. Die Präparate FN 5 N, EM-HV, HM, GS, H, M, SA, D, FN 5 D, P, S, SK, N und Na-K sind besser in Aqua dest. löslich. Bei einigen dieser Präparate besteht kein sehr großer Unterschied gegenüber ihrem Löslichkeitsverhalten in phys. Kochsalzlösung. Das Präparat SA war erst nach Temperatureinflüssen ab 100°C und höher in phys. Kochsalzlösung besser als in Aqua dest. löslich. Bessere Löslichkeit in phys. Kochsalzlösung zeigten die Präparate FR, RM und L.

Gleiche Löslichkeit in phys. Kochsalzlösung als auch in Aqua dest. wurde bei den Präparaten EM-6, V und SMB beobachtet, wobei SMB bei Temperaturen ab 100°C besser in phys. Kochsalzlösung löslich war. Das Präparat Ca ist ebenfalls bei höheren Temperaturen in phys. Kochsalzlösung besser löslich. Die Löslichkeit von

Tab. 5

Gesamteiweißgehalt einer 2 % igen Milcheiweiß-Lösung in Aqua dest. (30 Min. erhitzt)

Prüf.-	nicht erhitzt		56°C		70°C		80°C		90°C		100°C		115°C		125°C	
	a.2% bezogen	a.100% bezogen	a.2% bezogen	a.100% bezogen	a.2% bezogen	a.100% bezogen	a.2% bezogen	a.100% bezogen	a.2% bezogen	a.100% bezogen	a.2% bezogen	a.100% bezogen	a.2% bezogen	a.100% bezogen	a.2% bezogen	a.100% bezogen
FN5N	1,24	62,1	1,33	66,3	1,21	60,6	1,32	66,2	1,34	67,0	1,31	65,6	1,33	66,5	1,24	61,8
EM-6	1,27	63,4	1,35	67,4	1,31	65,3	1,34	67,1	1,38	69,2	1,35	67,7	1,33	66,5	1,26	63,2
EM-HV	1,28	63,9	1,31	65,4	1,29	64,7	1,37	68,6	1,38	69,2	1,36	68,0	1,22	60,9	1,13	56,6
LE	1,21	60,4	1,19	59,3	1,21	60,6	1,27	63,5	1,35	67,7	1,31	65,3	1,13	56,3	0,96	48,1
FR	1,26	63,2	1,29	64,4	1,34	66,8	1,39	69,5	1,43	71,5	1,4	69,9	1,19	59,5	1,08	54,0
RM	1,28	64,1	1,33	66,3	1,31	65,4	1,4	69,9	1,48	74,0	1,34	66,8	1,19	59,5	0,97	48,3
HM	1,04	51,9	1,12	55,8	1,12	55,8	1,1	55,0	1,18	59,0	1,16	57,9	1,16	58,2	1,06	52,9
GS	1,32	66,2	1,35	67,7	1,39	69,5	1,41	70,5	1,52	75,8	1,51	75,5	1,13	56,3	1,0	50,2
V	1,44	71,8	1,44	71,8	1,45	72,4	1,47	73,4	1,48	74,1	1,56	77,9	1,26	63,2	1,17	58,7
H	1,24	61,8	1,42	70,8	1,28	63,8	1,39	69,5	1,36	68,0	1,48	74,1	1,19	59,5	1,17	58,4
L	1,36	68,0	1,4	70,2	1,35	67,7	1,39	69,5	1,42	71,1	1,4	70,2	1,09	54,5	1,09	54,5
SMR	1,5	74,8	1,4	70,2	1,4	70,2	1,5	75,1	1,4	69,9	1,56	77,9	1,21	60,4	1,14	57,1
M	0,66	33,0	0,76	38,2	0,76	38,0	0,71	35,7	0,74	37,1	0,73	36,5	0,97	48,3	0,94	47,1
SA	1,3	65,0	1,29	64,7	1,35	67,7	1,23	61,5	1,29	64,7	1,14	56,8	1,24	61,8	1,09	54,5
Ca	1,29	64,4	1,31	65,3	1,32	65,8	1,23	61,5	1,34	66,8	1,09	54,7	1,16	57,9	1,05	52,7
D	1,03	51,7	1,28	63,8	1,26	62,9	1,13	56,6	1,18	59,0	1,0	50,2	1,17	58,7	1,06	53,2
FN5D	1,36	68,0	1,46	73,1	1,42	71,1	1,29	64,4	1,36	68,0	1,26	63,2	1,35	69,5	1,37	68,6
P	1,31	65,6	1,33	66,5	1,35	67,3	1,39	69,6	1,43	71,5	1,41	70,5	1,39	67,4	1,41	70,3
S	1,26	62,9	1,28	64,1	1,35	67,3	1,33	66,5	1,35	77,7	1,37	68,3	1,34	67,0	1,4	70,2
SK	0,9	45,1	0,96	47,8	1,01	50,5	1,12	55,8	1,21	60,6	1,21	60,6	1,29	64,7	1,27	63,5
N	1,25	62,4	1,25	62,6	1,27	63,7	1,27	63,6	1,32	65,8	1,27	63,5	1,35	67,7	1,43	71,7
Na-K	1,33	66,5	1,26	62,9	1,33	66,3	1,31	65,3	1,32	65,8	1,35	67,7	1,4	70,0	1,25	62,3

Tab. 6

Gesamteiweißgehalt einer 2 % igen Milcheiweiß-Lösung in phys. Kochsalzlösung (30 Min. erhitzt)

Präp.	nicht erhitzt		56°C		70°C		80°C		90°C		100°C		115°C		125°C	
	a.2% bezogen	a.100% bezogen	a.2% bezogen	a.100% bezogen	a.2% bezogen	a.100% bezogen	a.2% bezogen	a.100% bezogen	a.2% bezogen	a.100% bezogen	a.2% bezogen	a.100% bezogen	a.2% bezogen	a.100% bezogen	a.2% bezogen	a.100% bezogen
FN5N	1,25	62,3	1,28	63,9	1,08	53,8	1,09	54,5	1,07	53,3	1,09	54,7	1,11	55,3	1,11	55,5
EN-6	1,32	65,9	1,34	67,1	1,32	65,8	1,35	67,4	1,37	68,6	1,37	68,6	1,26	63,2	1,22	61,2
EM-HV	1,2	59,8	1,24	62,1	1,26	63,2	1,33	66,5	1,38	69,2	1,31	65,3	1,0	50,0	0,79	39,6
LE	1,22	60,9	1,24	62,1	1,22	61,2	1,27	63,6	1,27	63,5	1,34	66,8	1,05	52,7	0,79	39,4
FR	1,21	60,6	1,31	65,6	1,34	66,8	1,4	70,0	1,41	70,3	1,4	69,9	1,21	60,6	1,33	66,4
RM	1,28	64,1	1,33	66,6	1,32	65,8	1,4	69,8	1,41	70,5	1,39	69,5	1,39	69,5	1,15	57,6
HM	1,07	53,5	1,11	55,3	1,05	52,7	0,98	49,0	0,96	48,1	1,03	51,5	0,66	33,0	0,6	30,0
GS	1,32	65,8	1,41	70,5	1,38	69,2	1,4	70,2	1,34	66,8	1,49	74,4	1,02	51,2	0,88	44,2
V	1,47	73,4	1,42	71,1	1,44	72,1	1,5	74,8	1,42	70,8	1,56	77,9	1,29	64,4	1,16	57,9
..	1,03	51,5	1,26	62,9	1,28	63,8	1,41	70,5	1,34	66,8	1,49	74,4	1,17	58,7	1,06	53,2
L	1,37	68,3	1,44	71,8	1,47	73,4	1,41	70,5	1,39	69,5	1,41	70,5	0,83	41,3	0,71	35,3
SMB	1,4	70,2	1,44	71,8	1,5	74,8	1,48	74,1	1,45	72,4	1,59	79,3	1,44	72,1	1,26	63,2
M	0,56	28,0	0,56	28,1	0,51	25,7	0,43	21,3	0,41	20,3	0,3	15,0	0,37	18,4	0,41	20,6
GA	1,26	62,9	1,34	67,1	1,29	64,4	1,26	63,2	1,32	65,8	1,19	59,5	1,21	60,6	1,23	61,5
Ca	1,27	63,5	1,42	70,8	1,3	65,0	1,24	62,0	1,26	63,2	1,2	60,1	1,24	61,8	1,09	54,7
..	0,94	47,1	1,26	63,2	1,14	56,8	1,07	53,5	1,04	51,9	0,89	44,6	0,86	42,8	0,71	35,3
FN5D	1,34	66,8	1,46	72,8	1,25	62,3	1,2	59,8	1,25	62,3	1,21	60,6	1,28	64,1	1,25	62,6
P	1,24	62,3	1,28	64,1	1,36	68,2	1,29	64,4	1,3	65,0	1,06	53,2	1,06	53,1	0,78	39,0
S	1,18	59,0	1,28	64,1	1,15	57,6	1,19	59,4	1,24	61,8	1,12	55,8	1,21	60,6	1,12	56,2
SK	0,79	40,0	0,87	43,7	0,97	48,6	1,11	55,4	1,19	59,5	1,06	53,2	1,34	66,8	1,04	51,9
N	1,15	57,4	1,2	60,1	1,31	65,4	1,3	65,2	1,31	65,3	1,26	63,2	1,34	67,2	1,16	57,8
Na-K	1,23	61,5	1,31	65,3	1,31	65,6	1,31	65,3	1,44	72,1	1,39	64,6	1,35	67,4	1,22	61,1

Präparat LE ist bei höheren Temperaturen in Aqua dest. besser. Betrachtet man das Löslichkeitsverhalten der Milcheiweißpräparate in Abhängigkeit zur Temperatur, so zeigt sich für die Mehrzahl der Präparate kein signifikanter Unterschied. Mit steigender Temperatur ist eine langsame und geringfügige Steigerung der Löslichkeit bis zum Löslichkeitsmaximum bei 90°, 100° aber auch bei 115°C zu beobachten. Bei Temperaturen zwischen 100° und 115°C zeichnet sich eine starke Verringerung der Löslichkeit ab.

Das Löslichkeitsminimum der meisten Präparate liegt in dem Temperaturbereich von 115° bis 125°C.

Dieses Löslichkeitsverhalten konnte besonders bei den in Aqua dest. gelösten Präparaten beobachtet werden, während die in phys. Kochsalzlösung gelösten Präparate ihr Löslichkeitsmaximum bereits bei niedrigeren Temperaturen erreichten. Bei den in Aqua dest. und phys. Kochsalzlösung gelösten Präparaten SK und N sowie den in Aqua dest. gelösten Präparaten HM und M steigt die Löslichkeit vom Minimum in der nicht erhitzten Lösung kontinuierlich bis zum Maximum bei 115° bzw. 125°C an. Die aME-Präparate wiesen in Abhängigkeit zur Temperaturerhöhung nur geringfügige Löslichkeitsunterschiede auf. Bei der prozentualen Auswertung des Löslichkeitsverhaltens zeigte sich bei der Mehrzahl der Präparate eine 80 - 100 % ige Löslichkeit bis zur Denaturierungstemperatur. Für das Präparat HM ergab sich eine 70 - 80 % ige Löslichkeit in Aqua dest., und in phys. Kochsalzlösung betrug die Löslichkeit 60 - 70 %. Das weitaus schlechteste Löslichkeitsvermögen wurde beim Präparat M beobachtet.

Die Ergebnisse der Gesamteiweißbestimmungen in den Tab. 5 und 6 spiegeln die Ergebnisse der Löslichkeits-

bestimmungen der Tabb. 3 und 4 wieder, wobei der Gesamteiweißgehalt der Präparate nur in einem gewissen Prozentsatz der Löslichkeit zum Ausdruck kommt.

III. Vergleichende Prüfung verschiedener Extraktionsverfahren aus der Literatur an mit aME hergestellten Modellwürsten und Bestimmung der Gesamteiweißgehalte der Extraktionslösungen mittels der Biuretreaktion

Für die Aussagefähigkeit serologischer Nachweismethoden ist eine Standardisierung der Extraktionsverfahren für die Fremdeiweiße aus Fleischerzeugnissen von besonderer Bedeutung. Unterschiedliche Beschaffenheit des Untersuchungsmaterials, wie z.B. Rezeptur, Herstellungsprozeß und Erhitzung, haben u.a. Einfluß auf das serologische Untersuchungsergebnis (79).

1. Material und Methodik

Für die Herstellung der Modellchargen wurde eine einheitliche Grundrezeptur verwendet:

	40 % Rindfleisch
	30 % Speck
	30 % Eis
Zutaten:	2 % Nitritpökelsalz pro Kg Fleisch und Speck
	0,1 % Na-Ascorbat pro Kg Gesamtmasse Brät
	0,4 % Gewürz pro Kg Gesamtmasse Brät

Zu diesem Brät wurde aME in Konzentrationen von 0,5, 1,0, 1,5 und 2,0 % pro Kg Fleisch und Speck zugegeben. Die Modellchargen wurden 30 Minuten auf 70°, 100°, 115° und 125°C (Kerntemperatur) erhitzt.

Aus dem Kern der zu untersuchenden Proben wurden 5 g Material entnommen, vorzerkleinert und in ein 100 ml-Zentrifugenglas eingewogen. Zum Untersuchungsmaterial wurden 10 ml eines bestimmten Extraktionsmittels zugegeben. Nach der Durchführung der verschiedenen Extraktionsverfahren

wurden alle Extrakte 15 Minuten bei 3000 U/min abzentrifugiert und anschließend filtriert (Blauband Nr. 589³, Ø 12,5 cm). Vom Filtrat wurde der Gesamteiweißgehalt mittels der Biuretreaktion bestimmt. Für die Gesamteiweißbestimmung der Extrakte wurden aus drei Paralleluntersuchungen die Mittelwerte errechnet.

a) Einfluß der Vorbehandlung des Untersuchungsmaterials auf die Extraktion

Als Extraktionsmittel wurde phys. Kochsalzlösung, pH 7,2, verwendet. Zur Klärung des Einflusses von Zerkleinerung und Lyophilisation auf die Extraktion wurde je ein Teil der Probe im Mörtel mit Seesand gleichmäßig verrieben, ein Teil lyophilisiert und ein Teil lyophilisiert und homogenisiert. Die verschiedenen Vorbehandelten Extraktionsgemische wurden mit phys. Kochsalzlösung versetzt und 2 Stunden im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Im weiteren wurde geprüft, inwieweit sich die Extraktion durch anhaltendes Rühren der Extrakte während der Extraktionszeit verbessern ließe. Von den Proben wurde deshalb während des Extraktionsvorganges je eine Probe ungerührt sowie je eine Probe, auf dem Magnetrührer gerührt, extrahiert.

b) Einfluß des pH-Wertes des Extraktionsmittels auf die Extraktion

Um den Einfluß des Lyophilisationsvorganges nochmals zu überprüfen, wurde je eine Probe vor der Extraktion lyophilisiert und je eine Probe ohne vorheriger Lyophilisation extrahiert.

Als Extraktionsmittel wurden phys. Kochsalzlösung, die im Extraktionsgemisch mit Natronlauge bzw. Salzsäure auf pH 6,5, 7,2 und 8,6 eingestellt worden war, sowie

Veronalpuffer mit pH 8,6 verwendet.

Die Proben wurden 2 Stunden im Brutschrank bei 37°C , auf dem Magnetrührer gerührt, extrahiert.

c) Einfluß der Extraktionszeit und -temperatur verschiedener Extraktionsverfahren auf die Extraktion

Bei der Untersuchung sollte die Mindestextraktionszeit, die für eine optimale Extraktion notwendig ist, ermittelt werden. Alle untersuchten Proben wurden mit dem Ultra-Turrax homogenisiert; als Extraktionsmittel diente phys. Kochsalzlösung, pH 7,2.

Die Proben wurden jeweils 1, 2 bzw. 3 Stunden im Brutschrank bei 37°C auf dem Magnetrührer gerührt oder jeweils 1, 2 bzw. 3 Stunden im Schüttelwasserbad bei 40°C extrahiert. Außerdem wurde ein Teil der Proben 2, 12 bzw. 24 Stunden bei Zimmertemperatur auf dem Magnetrührer extrahiert.

d) Einfluß der Extraktionsmittelmenge auf die Extraktion

Vom Extraktionsmittel phys. Kochsalzlösung, pH 7,2, wurden 5 g Untersuchungsmaterial Mengen von 7,0, 8,0, 9,0, 10,0, 11,0 bzw. 13,0 ml zugesetzt und 30 Sekunden im Ultra-Turrax homogenisiert. Die so aufgearbeiteten Proben wurden 2 Stunden im Schüttelwasserbad bei 40°C extrahiert.

2. Ergebnisse

Die Untersuchungsergebnisse sind in den Tab. 7, 8, 9 und 10 zusammengestellt. Aus Tab. 7 wird ersichtlich, daß die Extraktion unter anhaltendem Rühren auf dem Magnetrührer während der Extraktionszeit nach vorheriger Lyophilisation

Tab. 7

Einfluß der Vorbehandlung und Zerkleinerung des Untersuchungsmaterials auf die Extraktion

Gesamteiweißbestimmung mittels der Biuretreaktion in mg pro ml

Extraktionsmittel: phys. Kochsalzlösung pH 7,2

Extraktionsdauer : 2 Std. im Brutschrank bei 37°C

	M		L		L u. H		H	
	U	G	U	G	U	G	U	G
0,5 % , 70°C	1,61	1,72	0,97	2,52	1,02	4,98	1,13	1,45
1,0 % , 100°C	2,17	2,99	1,39	4,45	2,34	5,91	3,18	2,87
1,5 % , 115°C	4,85	3,61	4,12	5,91	6,99	12,12	8,66	11,05
2,0 % , 125°C	7,54	6,36	6,14	7,88	9,19	11,79	10,74	9,37

Zeichenerklärung:

M = im Mörser mit Seesand zerrieben

L = zerkleinert und lyophilisiert

H = im Ultra-Turrax homogenisiert

U = nicht gerührt

G = auf dem Magnetrührer gerührt

und Homogenisierung der Wurstproben die höchsten extrahierten Eiweißgehalte ergab. Beim Vergleich der Eiweißgehalte der Extrakte, die unterschiedlich vorbehandelt worden waren, zeigte sich bei den nicht gerührten Extraktionsgemischen dann eine Überlegenheit, wenn das Untersuchungsmaterial vorher im Ultra-Turrax homogenisiert worden war. Bei den unter ständiger Bewegung extrahierten Proben zeigten die Extraktionslösungen die höchsten Gesamteiweißgehalte, die aus Proben extrahiert worden sind, die lyophilisiert und anschließend homogenisiert worden waren. Die höchsten Eiweißgehalte wurden mit dem Extraktionsverfahren, bei dem eine Vorbehandlung des Wurstmaterials mittels der Lyophilisation, anschließender Homogenisierung und ständiger Bewegung des Extraktionsgemisches erfolgte, erhalten.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde in der nächsten Versuchsreihe die Extraktion auf dem Magnetrührer durchgeführt. Bei der auf dem Magnetrührer durchgeführten Extraktion wurde bei dem im Mörser mit Seesand zerriebenen Untersuchungsmaterial gegenüber den anderen Methoden ein geringerer Gesamteiweißgehalt bestimmt. Die geringsten Gesamteiweißgehalte wurden mittels der Extraktionstechnik, bei der das Untersuchungsmaterial nur lyophilisiert und ohne Bewegung extrahiert wurde, erhalten. In Tab. 8 sind die Untersuchungsergebnisse über den Einfluß verschiedener pH-Werte in phys. Kochsalzlösung und von Veronalpuffer, pH 8,6, auf den Gesamteiweißgehalt der Extraktionslösungen zusammengefaßt. Bei den Extraktionen nach unterschiedlicher Materialaufarbeitung zeigte einmal das nur homogenisierte und ein andermal das lyophilisierte und homogenisierte Wurstmaterial bessere Extraktionsergebnisse. Beim Vergleich der beiden Extraktionsmittel - un-

Tab. 8

Einfluß verschiedener pH-Werte auf die Extraktion

Gesamtweißbestimmung mittels der Biuretreaktion in mg pro ml

Extraktionsmittel: phys. Kochsalzlösung

Veronal-Puffer pH 8,6

Extraktionsdauer : 2 Std. im Brutschrank bei 37°C

	pH 6,5		pH 7,2		pH 8,6		V pH 8,6	
	H,G	L u.H,G	H,G	L u.H,G	H,G	L u.H,G	H,G	L u.H,G
0,5 % , 125°C	0,76	1,83	1,6	1,18	0,71	1,5	0,81	0,55
1,0 % , 70°C	1,07	0,71	1,07	0,65	1,07	0,55	0,86	0,5
1,5 % , 100°C	1,45	1,5	1,56	1,23	1,61	1,02	1,07	1,13
2,0 % , 115°C	0,6	2,06	2,0	1,07	1,29	1,56	0,55	1,02

Zeichenerklärung siehe Tabelle 7

V = Veronal-Puffer pH 8,6

abhängig vom pH-Wert - war phys. Kochsalzlösung dem Veronalpuffer überlegen.

Beim Vergleich der verschiedenen pH-Werte der phys. Kochsalzlösung ergaben die Extraktionslösungen am oder unter dem Neutralpunkt (pH 7,2 und pH 6,5) die besten Ergebnisse. Die mittels Homogenisierung zerkleinerten Wurstproben wiesen bei der Extraktion mit phys. Kochsalzlösung mit einem pH von 7,2 und die durch Lyophilisation und Homogenisierung vorbehandelten Proben bei pH 6,5 die besten Gesamteiweißgehalte auf.

In weiteren Versuchsreihen wurde mit phys. Kochsalzlösung, pH 7,2, als Extraktionsmittel gearbeitet. In Tab. 9 sind die Ergebnisse dreier Extraktionsverfahren in Abhängigkeit von Extraktionszeit und -temperatur zusammengefaßt.

Beim Vergleich der angewendeten 3 Extraktionsverfahren wurde deutlich, daß bei der Extraktion bei Zimmertemperatur ein höherer Gesamteiweißgehalt der Extrakte nachgewiesen werden konnte. Bei der Extraktion im Brutschrank wurde die Beziehung zwischen längerer Extraktionszeit und höherem Gesamteiweißgehalt nicht so deutlich. Dagegen ließ sich bei der Extraktion im Schüttelwasserbad eine Erhöhung des Proteingehaltes in Abhängigkeit zur Extraktionszeit nicht feststellen. Hier war bereits nach 2 Stunden das Maximum des Eiweißgehaltes erreicht. Bei 24-stündiger Extraktion der auf 70° und 100°C erhitzten Modellwürste mit einem 1,5 und 2,0 % igen Milcheiweißzusatz konnte bei Zimmertemperatur im Vergleich zu den anderen Extraktionstechniken der höchste Gesamteiweißgehalt ermittelt werden.

In Tab. 10 sind die Ergebnisse des Einflusses der Extraktionsmittelmenge auf die Extraktion zusammengestellt. Dabei zeigte sich, daß bei der Extraktion der auf 100°C erhitzten Wurstproben mit einem 0,5 % igen Milcheiweißzusatz die Extraktionsmittelmenge von 7 und 9 ml die höchsten

Tab. 2

Einfluß der Extraktionszeit und -temperatur bei verschiedenen Extraktionsverfahren

Gesamteiweißbestimmung mittels der Biuretreaktion in mg pro ml

Extraktionsmittel: phys. Kochsalzlösung pH 7,2

	BS H, G			WSB H			ZT H, G		
	1 Std.	2 Std.	3 Std.	1 Std.	2 Std.	3 Std.	2 Std.	12 Std.	24 Std.
0,5 % , 115°C	1,72	1,61	1,72	2,64	2,87	2,46	0,65	1,39	1,56
1,0 % , 125°C	1,5	2,99	2,87	3,36	3,86	3,67	0,91	1,83	2,52
1,5 % , 70°C	0,81	0,45	0,45	0,55	0,55	0,5	0,35	1,07	2,34
2,0 % , 100°C	0,45	0,6	1,23	0,76	1,18	0,45	0,3	1,13	1,56

Zeichenerklärung siehe Tabelle 7

BS = im Brutschrank bei 37°C extrahiert

WSB = im Wasserschüttelbad bei 40°C extrahiert

ZT = bei ca 22°C Zimmertemperatur extrahiert

Tab. 10

Einfluß der Extraktionsmittelmenge auf die Extraktion

Gesamtproteinbestimmung mittels der Biuretreaktion in mg pro ml

Extraktionsmittel: phys. Kochsalzlösung pH 7,2

Extraktionsdauer : 2 Std. im Wasserschüttelbad bei 40°C

	7 ml H	8 ml H	9 ml H	10 ml H	11 ml H	13 ml H
0,5 % , 100°C	0,97	0,55	0,91	0,65	0,76	0,4
1,0 % , 115°C	3,11	2,23	1,78	2,0	1,56	1,5
1,5 % , 125°C	1,07	1,18	1,72	1,23	1,13	0,6
2,0 % , 70°C	1,02	1,13	1,29	1,23	1,07	1,02

Zeichenerklärung siehe Tabelle 7

Gesamteiweißgehalte ergab. Bei der Extraktion von bis auf 115°C erhitztem Material mit einem 1,0 % igen Milcheiweißzusatz zeigten 7,0 ml Extraktionsmittel den höchsten Gehalt an Eiweiß, während bei der Extraktion von bis auf 125° sowie auf 70°C erhitztem Wurstmaterial mit einem 1,5 bzw. 2,0 % igen Milcheiweißzusatz mit einer Menge von 9 ml des Extraktionsmittels die besten Extraktionsergebnisse erzielt werden konnten.

IV. Antigenitätsuntersuchungen verschiedener Milcheiweißpräparate mittels Agar-Gel-Diffusion

In dieser Untersuchungsreihe sollte geprüft werden, ob zwischen den untersuchten Milcheiweißpräparaten signifikante Unterschiede in ihrer Antigenität * bestehen. Zum anderen sollte untersucht werden, welches der untersuchten Präparate die beste Antigenität besitzt und somit für die Gewinnung von Antiseren gegen aME am geeignetsten erscheint.

Außerdem sollte geprüft werden, inwieweit eine Korrelation zwischen Löslichkeit und Antigenität der untersuchten Präparate besteht.

Die gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexe wurden in der Agar-Gel-Diffusion dargestellt, und die durch Immunisierung mit "Vollantigenen" (Milcheiweißpräparate) gewonnenen Antiseren gegen jedes Milcheiweißpräparat geprüft und verglichen. Die Immunisierung erfolgte einmal nach der von HERRMANN (71) und zum anderen nach der von KLUGE-WILM (64) angegebenen Methodik. Bei der Untersuchung verschiedener Präparate auf ihre Antigenität und beim Vergleich der angewandten Immunisierungsmethoden muß grundsätzlich die unterschiedliche Eignung der Serumspender zur Antikörperbildung berücksichtigt werden.

1. Material und Methodik

Zur Immunisierung kamen 18 Kaninchenbastarde mit einem Durchschnittsgewicht von ca. 4 Kilo. Das Geschlecht der Tiere wurde nicht berücksichtigt. Als Antigene wurden die in Tab. 1 aufgeführten Milcheiweißpräparate verwendet. Um beim Vergleich der beiden Immunisierungsmethoden die individuelle Antikörperbildung der Serumspender ausschließen zu können, wurden 15 Kaninchen erst nach der Methode von KLUGE-WILM (64) immunisiert und nach der Serumentnahme für die Untersuchung nach der Methode von HERRMANN (71) erneut

* nach der heutigen Nomenklatur besser Immunogenität

immunisiert. Drei Kaninchen wurden nach der Methode von HERRMANN (71) mit den Milcheiweißpräparaten D, H und S immunisiert.

a) Immunisierung nach KLUGE-WILM (64)

Das Antigen wurde 15 Minuten auf 100°C erhitzt und die hochkonzentrierte Antigenlösung lyophilisiert. Die Immunisierung erfolgte entsprechend der Angabe aus der Literatur:

1. Tag: 4 mg Antigen wurden mit phys. Kochsalzlösung gelöst. Zu dieser 1,0 ml - Antigenlösung wurden 1,0 ml Freundsches Adjuvans complete zugegeben und eine feste Emulsion hergestellt. 2,0 ml dieser stabilen Emulsion, verteilt auf 4 Körperstellen, wurden intra- und subcutan injiziert.

14. Tag: 10 mg Antigen, gelöst in 3,0 ml phys. Kochsalzlösung, wurden subcutan injiziert.

15. und 16. Tag: je 10 mg Antigen, gelöst in 3,0 ml phys. Kochsalzlösung, wurden intravenös injiziert.

Am 23. Tag wurde der Antiserum-Titer bestimmt. Bei einem ausreichenden Titer erfolgte die Blutabnahme am 24. Tag. Ansonsten wurde eine Auffrischung wie am 1. Tag durchgeführt. Nach weiteren 14 Tagen, also am 39. Tag, erfolgte die Blutentnahme aus der Ohrvene zur Serumgewinnung für die Agar-Gel-Diffusion.

b) Immunisierung nach HERRMANN (71)

Die Herstellung des Antigens erfolgte nach dem Hitze-Alkali-Präzipitin von W.A.SCHMIDT (113). Eine 10 % ige Milcheiweißlösung wurde im Starmix mit phys. Kochsalzlösung gut verrührt, 30 Minuten bei 70°C im Wasserbad unter öfterem Umrühren erhitzt, anschließend mit 1 n Natronlauge versetzt und mit 1 n Salzsäure auf pH 7,0 - 7,2 eingestellt und nochmals 15 Minuten bei 70°C im Wasserbad gehalten.

Nach dem Abkühlen wurden die Lösungen für die Immunisierung homogenisiert und in einer 1,5 % igen Aluminiumhydroxydsuspension aufgeschwemmt.

Für die Immunisierung wurden die Kaninchen im Abstand von 2 Tagen mit je 10 ml Antigenlösung subcutan injiziert. 5 Tage nach der letzten Injektion wurden die Tiere entblutet (71) und das überstehende Serum abzentrifugiert. Zur Konservierung wurden die Antiseren mit Merthiolat 1 : 10 000 versetzt, in 2,0 ml Ampullen abgefüllt und lyophilisiert.

c) Durchführung der Agar-Gel-Diffusion

Die Antigenität der geprüften Milcheiweißpräparate wurde mittels der Agar-Gel-Diffusion nach dem α -Verfahren untersucht.

20 ml eines 1 % igen Reinagars wurden in Petrischalen ($\varnothing$ 9 cm) ausgegossen. Nach dem Erstarren des Agars wurden je Platte drei Rosetten in den Agar gestanzt. Um das zentral ausgestanzte Loch wurden ringsherum im Abstand von 6 mm sechs weitere Stanzlöcher angeordnet. In das Zentrum der Rosetten wurden zwei Tropfen der Antiseren mit einer Kapillarpipette verbracht und rundherum die verschiedenen Antigene mit entsprechenden Verdünnungen (1 : 10 und 1 : 100) eingefüllt. Als Antigen diente eine 2 % ige Milcheiweißsuspension. Die verschlossenen Platten wurden 24 Stunden im Brutschrank bei 27°C inkubiert und anschließend beurteilt.

Die Reaktion wurde in Abhängigkeit zur Anzahl der gebildeten Präzipitationsbanden wie folgt beurteilt:

++++	= stark positiv
+++	= stark positiv
++	= positiv
+	= positiv
+	= schwach positiv
±	= fraglich
-	= negativ

Von der Anzahl der gebildeten Präzipitationsbanden wurde auf die Stärke der Antigen-Antikörper-Reaktion (in Prozent) der Antiseren mit den geprüften Milcheiweißpräparaten geschlossen.

2. Ergebnisse

Nach der Immunisierung nach KLUGE-WILM (64) fielen während der Immunisierung nach HERRMANN (71) 6 Kaninchen, die mit den Präparaten RM, V, L, M, D, FN 5 D immunisiert worden waren, aufgrund interkurrenter Erkrankungen aus.

Die Ergebnisse der Antigenitätsuntersuchungen sind in den Abb. 1 bis 18 zusammengefaßt.

Der Vergleich der beiden Immunisierungsverfahren zeigte, daß mittels Immunisierungsmethode nach HERRMANN (71) eine stärkere Antikörperbildung erzielt werden konnte. Die so gewonnenen Antiseren bildeten in der Agar-Gel-Diffusion mit den verschiedenen Milcheiweißpräparaten eine größere Anzahl scharf voneinander getrennter Präzipitationsbanden. Obwohl es sich bei allen untersuchten Antigenen um handelsübliche aME-Präparate handelt, kann, unter Berücksichtigung der individuellen Eignung der Serumspender zur Antikörperproduktion, durch diesen Versuch deutlich gemacht werden, daß die verschiedenen Präparate nicht die gleiche Antigenität besitzen. Trotz ihrer Antigenitätsunterschiede reagierten jedoch die durch Immunisierung nach HERRMANN (71) mit komplexen Antigenen gewonnenen Antiseren mit allen zur Untersuchung anstehenden Präparate positiv, während einige Antiseren, nach KLUGE-WILM (64) hergestellt, mit den aME Präparaten negativ reagierten. Bei den Präparaten GS (Abb. 7), EM-6 (Abb. 1) sowie SMB (Abb. 10) konnte im Vergleich zu den Präparaten Ca (Abb. 13), RM (Abb. 5) und FN 5 D (Abb. 15) eine hohe Antigenität beobachtet werden. Von den Antiseren, welche nur durch Immunisierung nach HERRMANN (71) gewonnen worden waren, zeigte das Antiserum gegen das Präparat S (Abb. 18) die beste Antigenität. Beim Vergleich der nur durch Immunisierung nach HERRMANN (71) gewonnenen Antiseren mit denen, welche nach Immunisierung nach KLUGE-WILM (64) und anschließender Immunisierung nach HERRMANN (71) gewonnen worden waren, zeigte sich, daß bei den mittels der einfachen Immunisierung gewonnenen Antiseren die Antigen-Antikörper-Reaktion sehr viel schwächer ausgeprägt war.

Abb. 1

Antigenitätsuntersuchung

Antiserum gegen Antigen EM-6

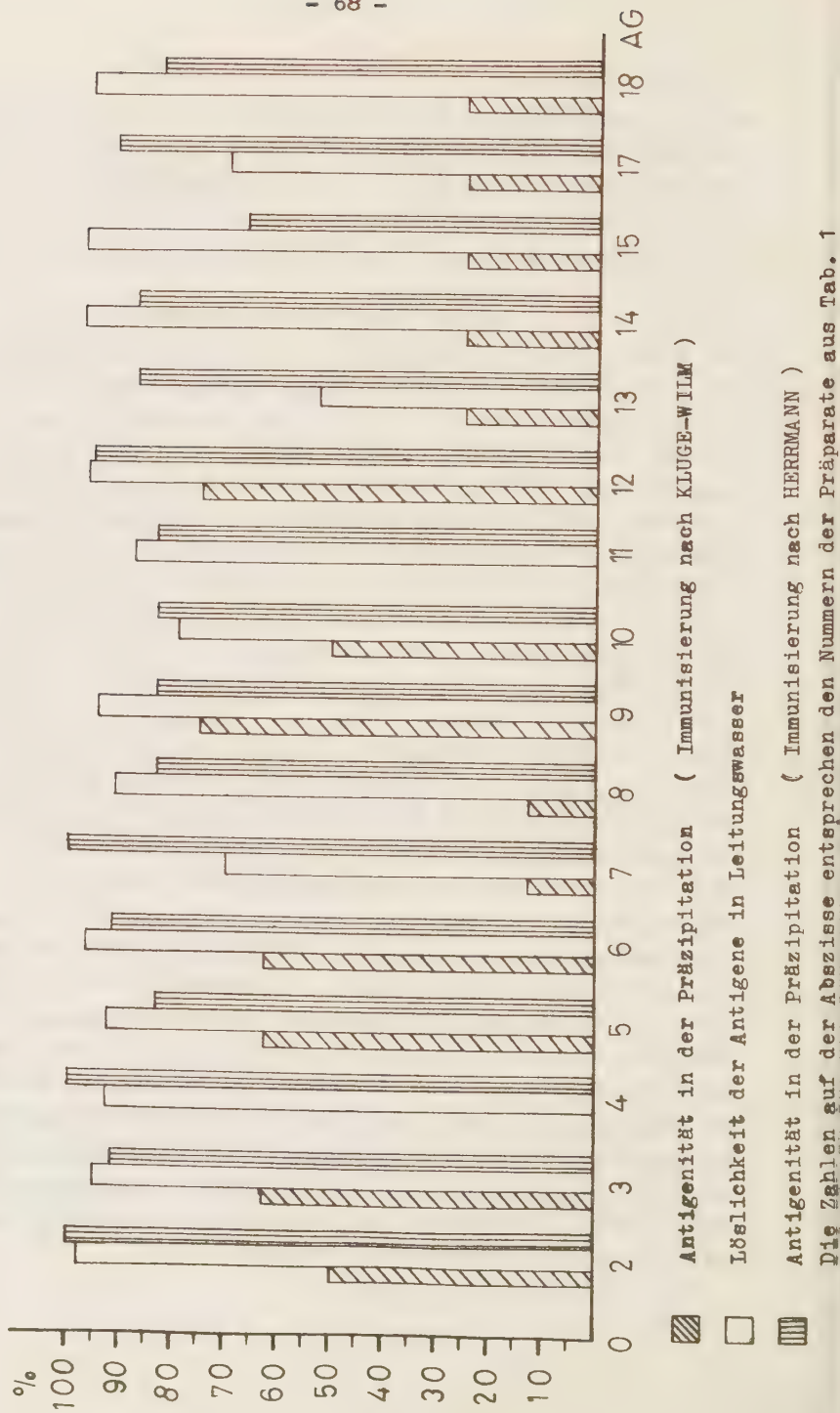
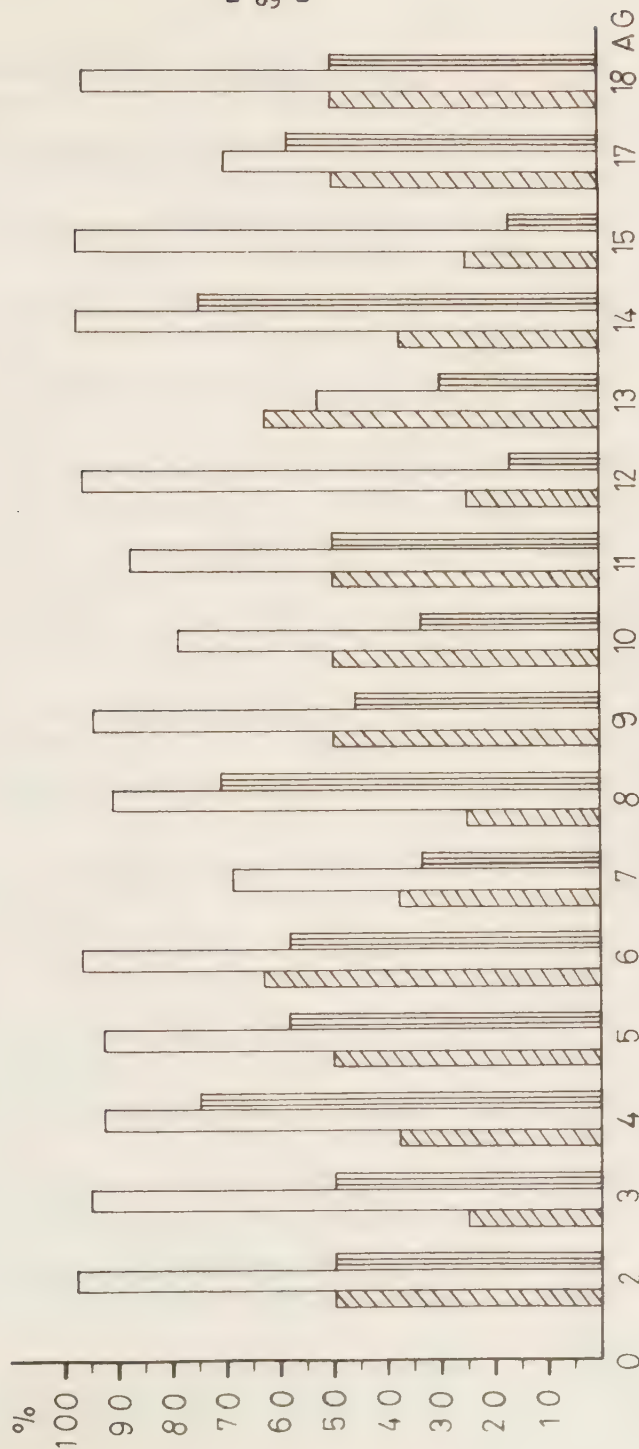


Abb. 2

Antigenitätsuntersuchung

Antiserum gegen Antigen EM-HV

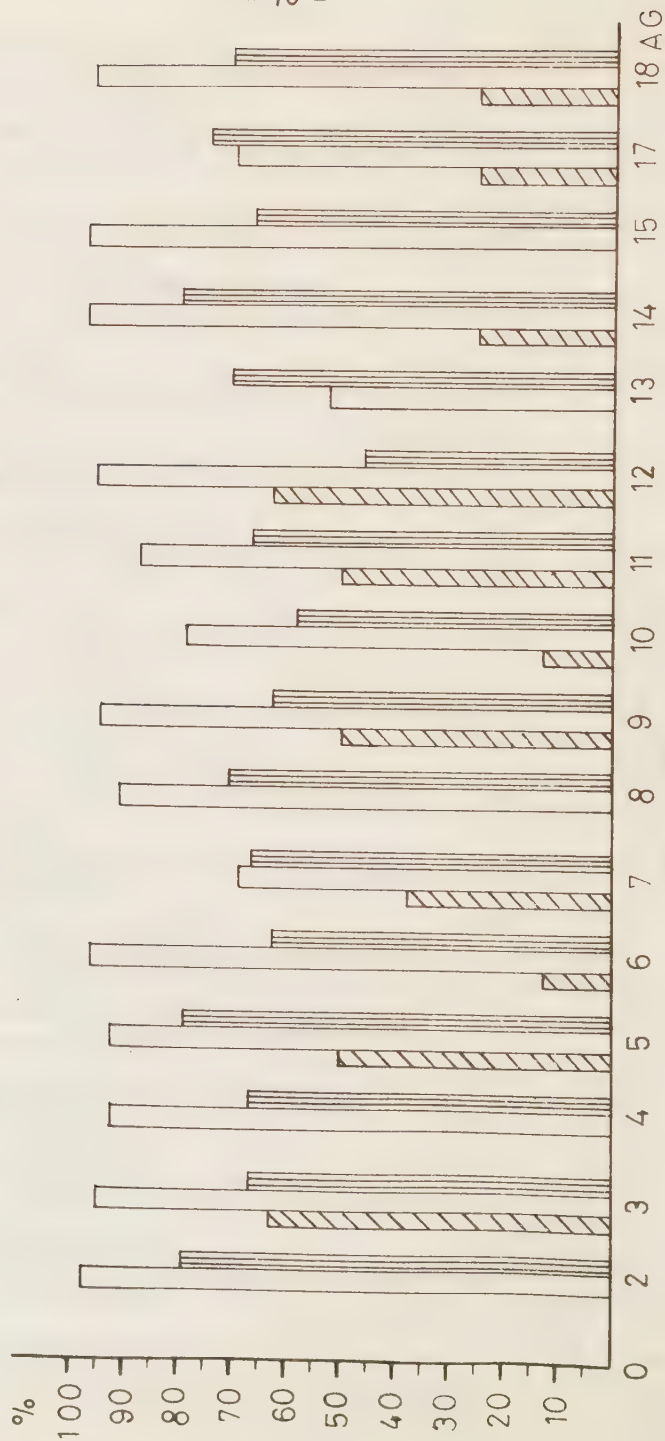


Zeichenerklärung siehe Abb. 1

Abb. 3

Antigenitätsuntersuchung

Antiserum gegen Antigen LE

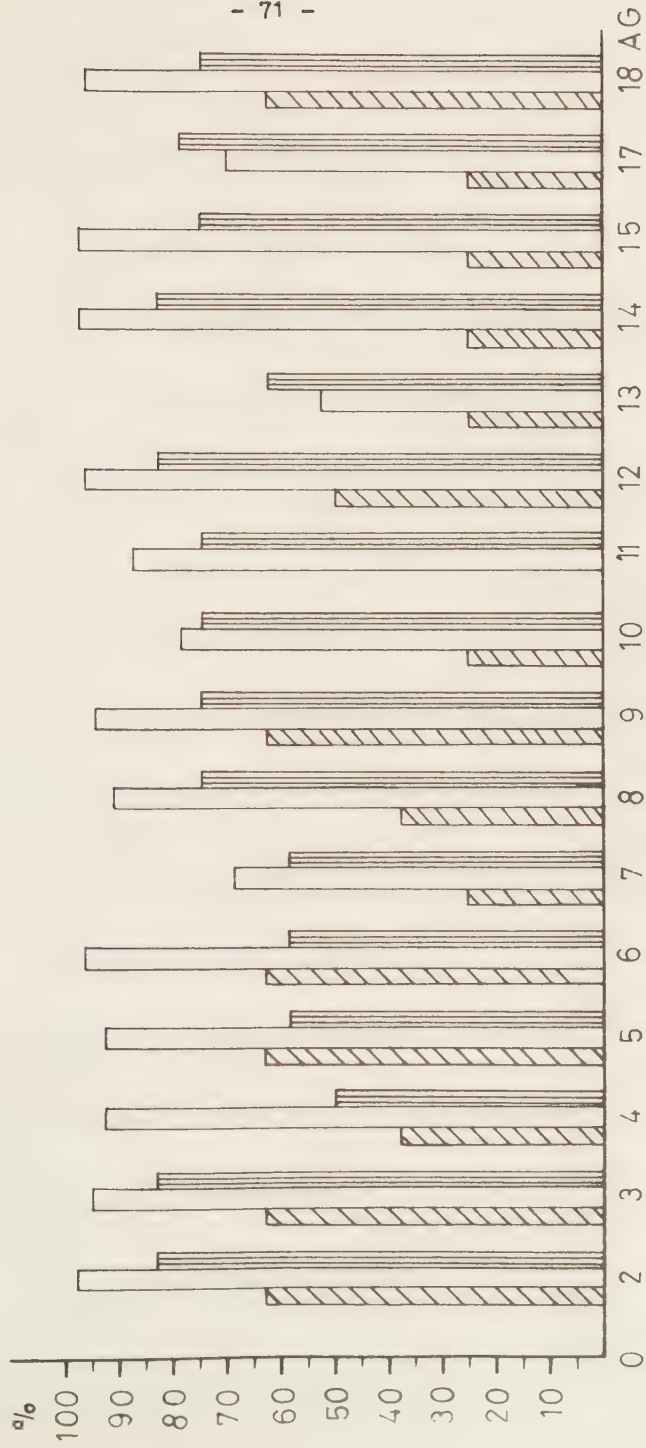


Zeichenerklärung siehe Abb. 1

Abb. 4

Antigenitätsuntersuchung

Antiserum gegen Antigen FR

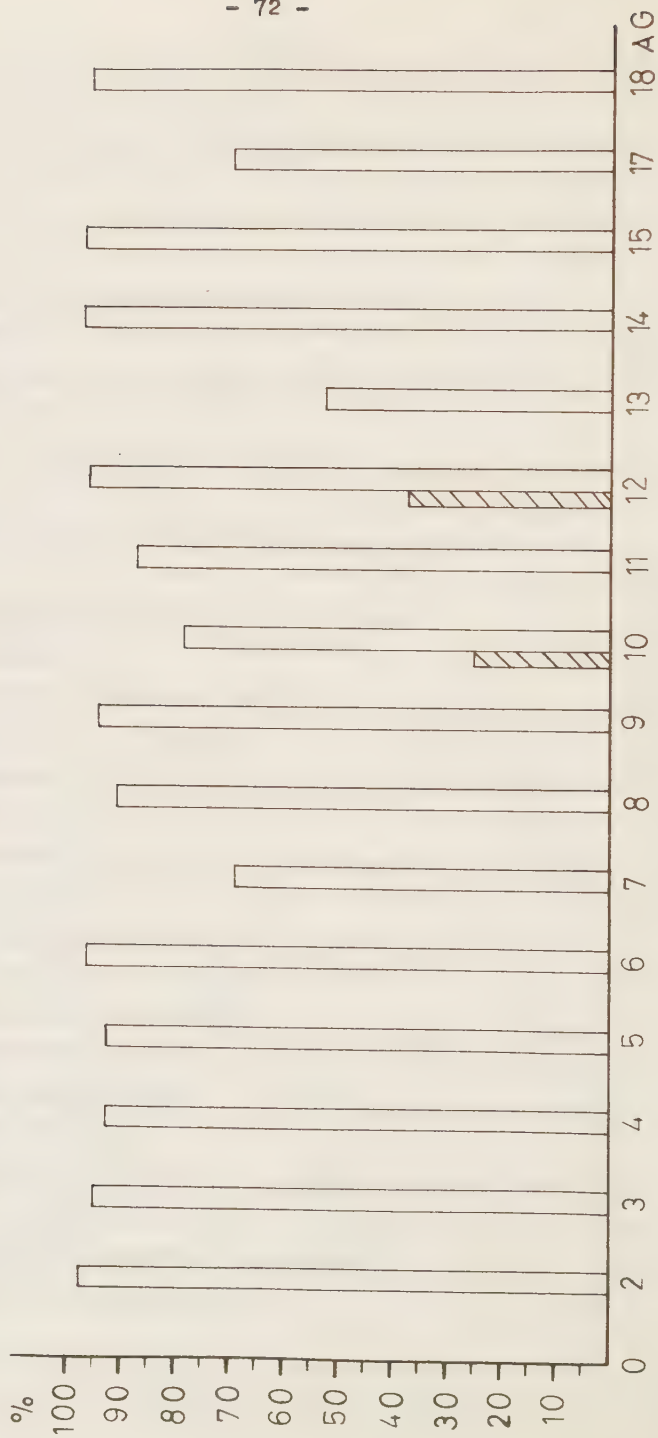


Zeichenerklärung siehe Abb. 1

Abb. 5

Antigenitätsuntersuchung

Antiserum gegen Antigen RM

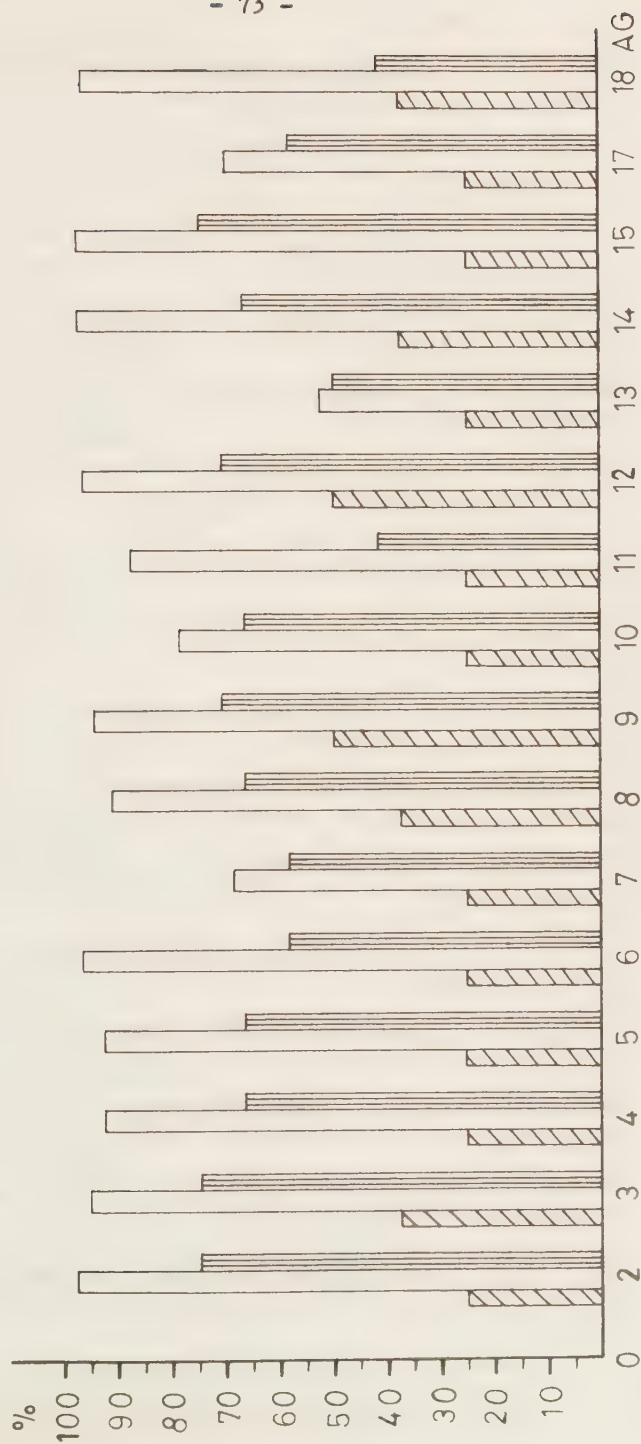


Zeichenerklärung siehe Abb. 1

Abb. 6

Antigenitätsuntersuchung

Antiserum gegen Antigen HM



Zeichenerklärung siehe Abb. 1

Abb. 7

Antigenitätsuntersuchung

Antiserum gegen Antigen GS

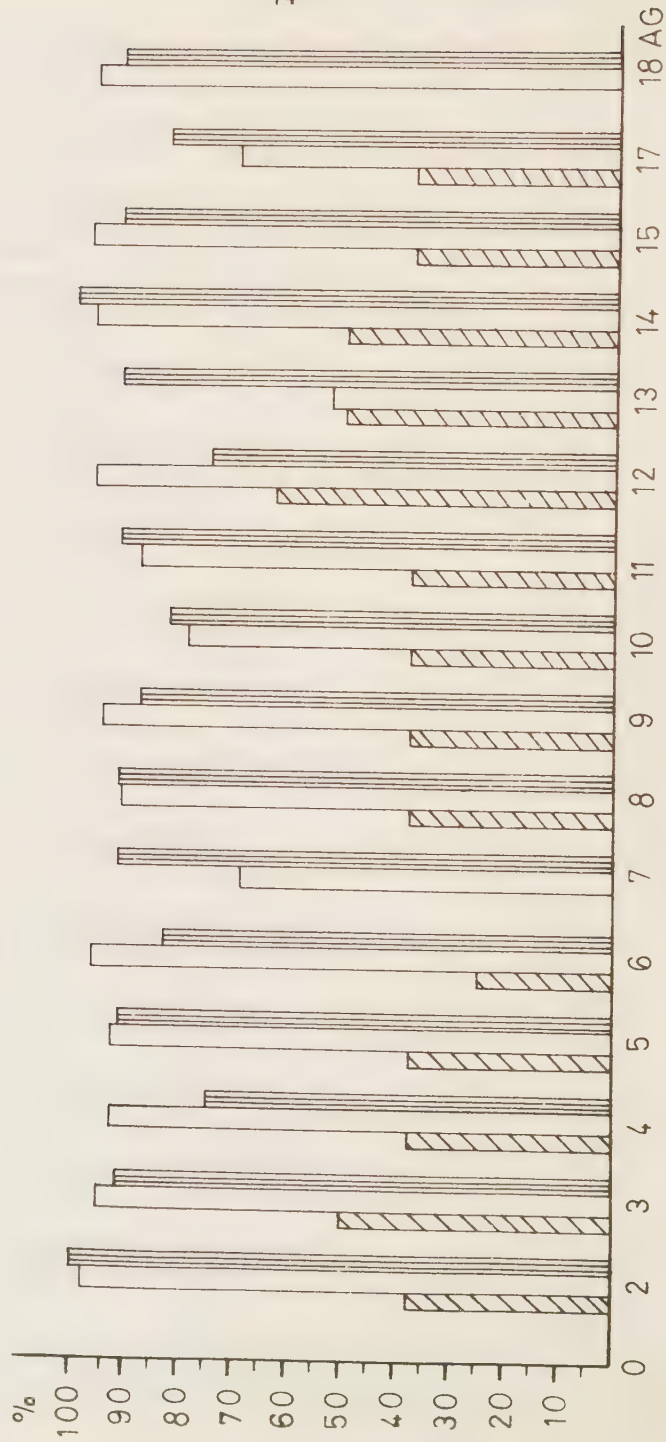


Abb. 8

Antigenitätsuntersuchung

Antiserum gegen Antigen V

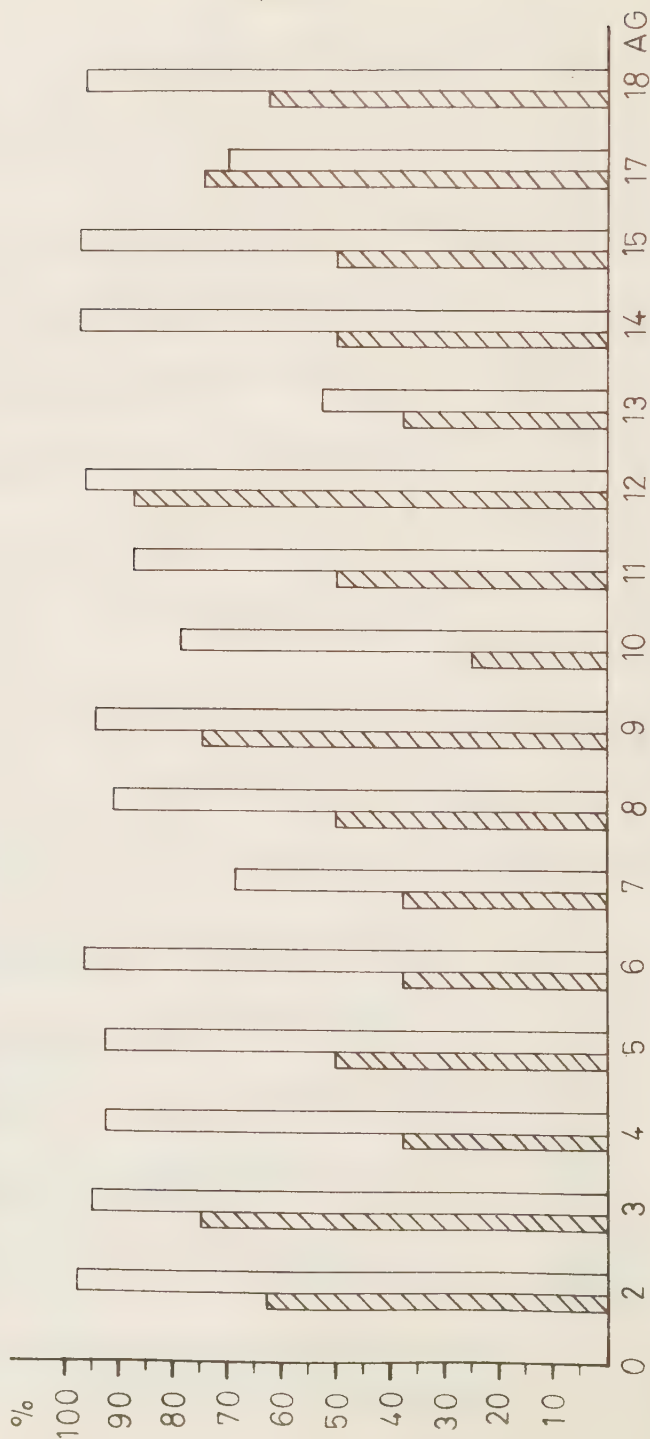


Zeichenerklärung siehe Abb. 1

Abb. 2

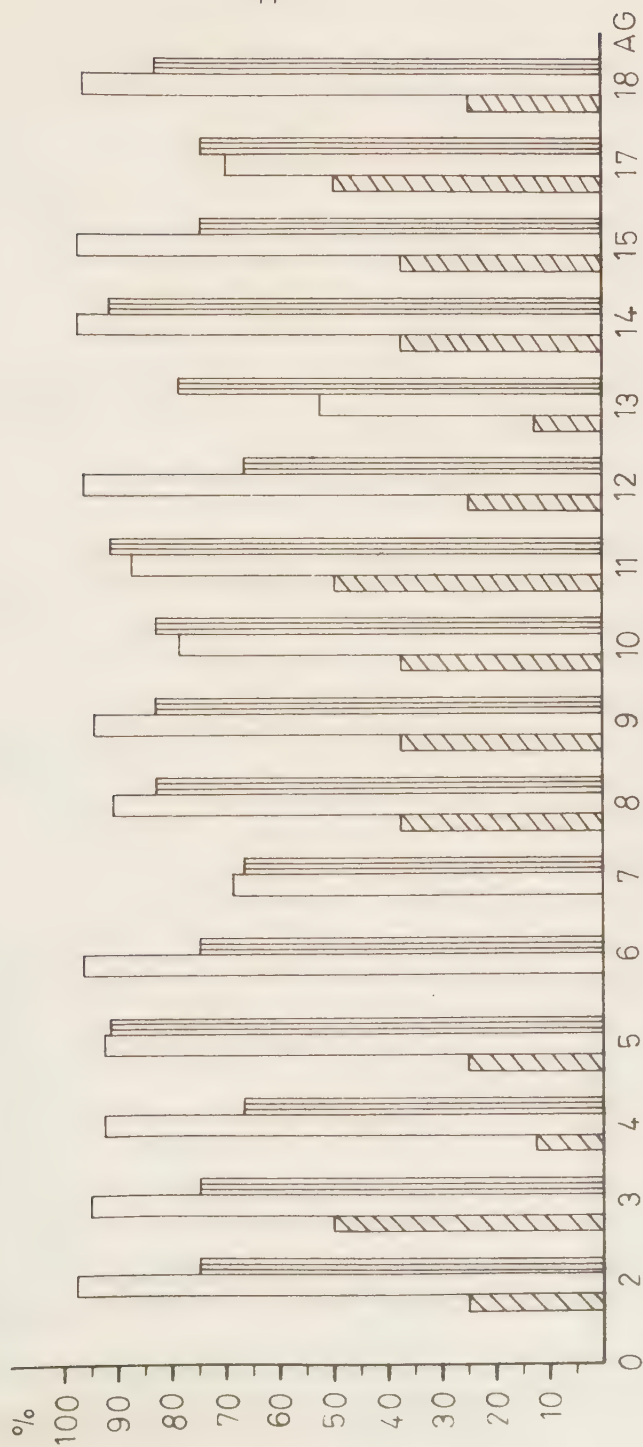
Antigenitätsuntersuchung

Antiserum gegen Antigen L



Zeichenerklärung siehe Abb. 1

Antiserum gegen Antigen SMB



Zeichenerklärung siehe Abb. 1

Abb. 11

Antigenitätsuntersuchung

Antiserum gegen Antigen M

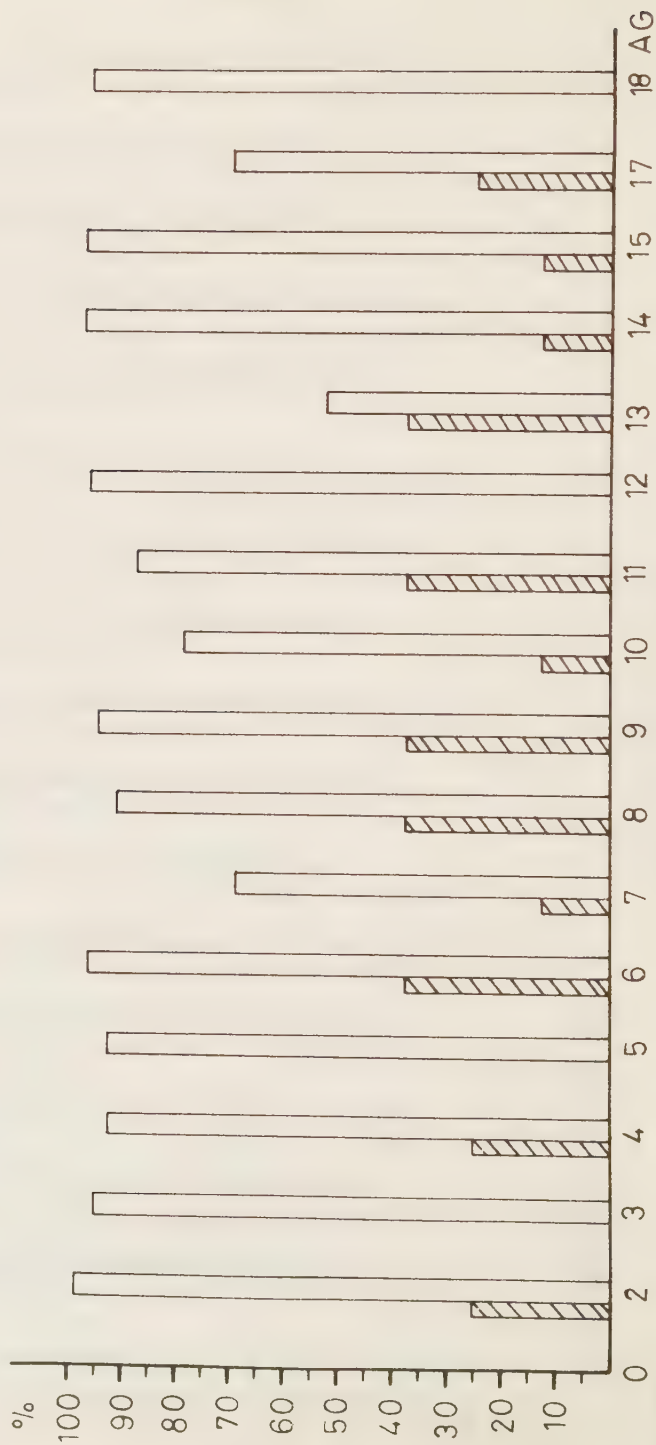
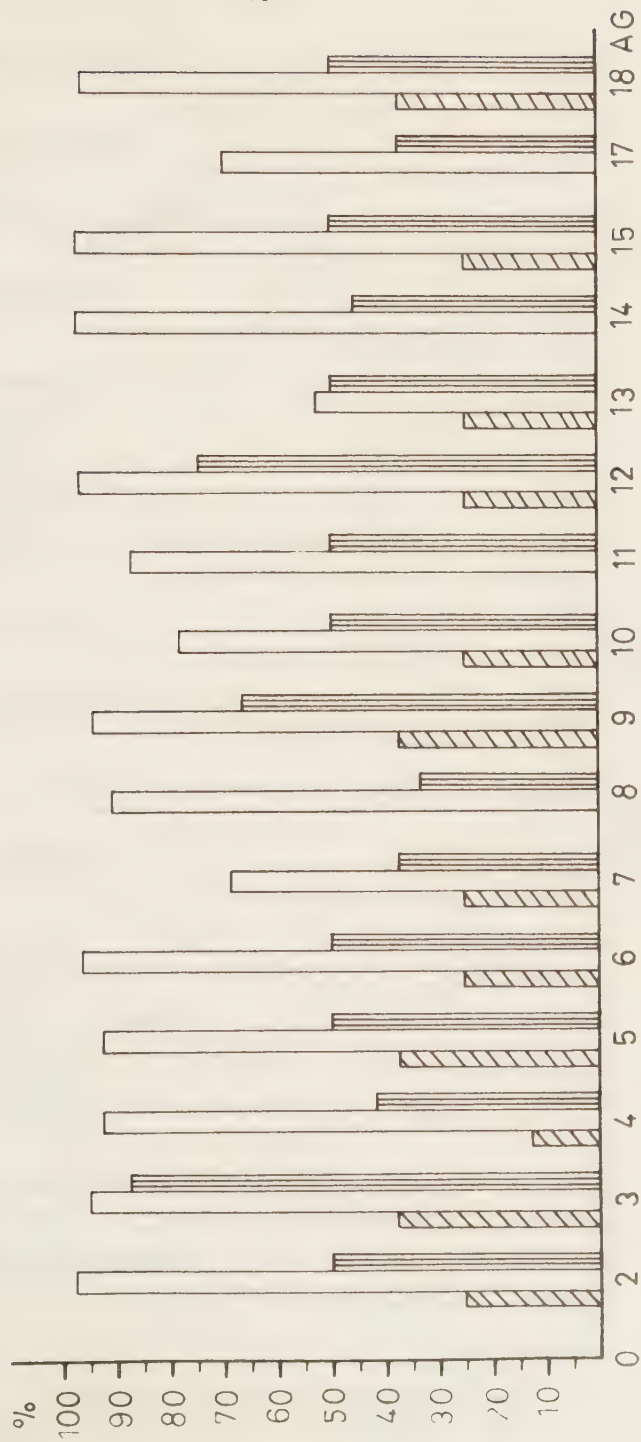


Abb. 12

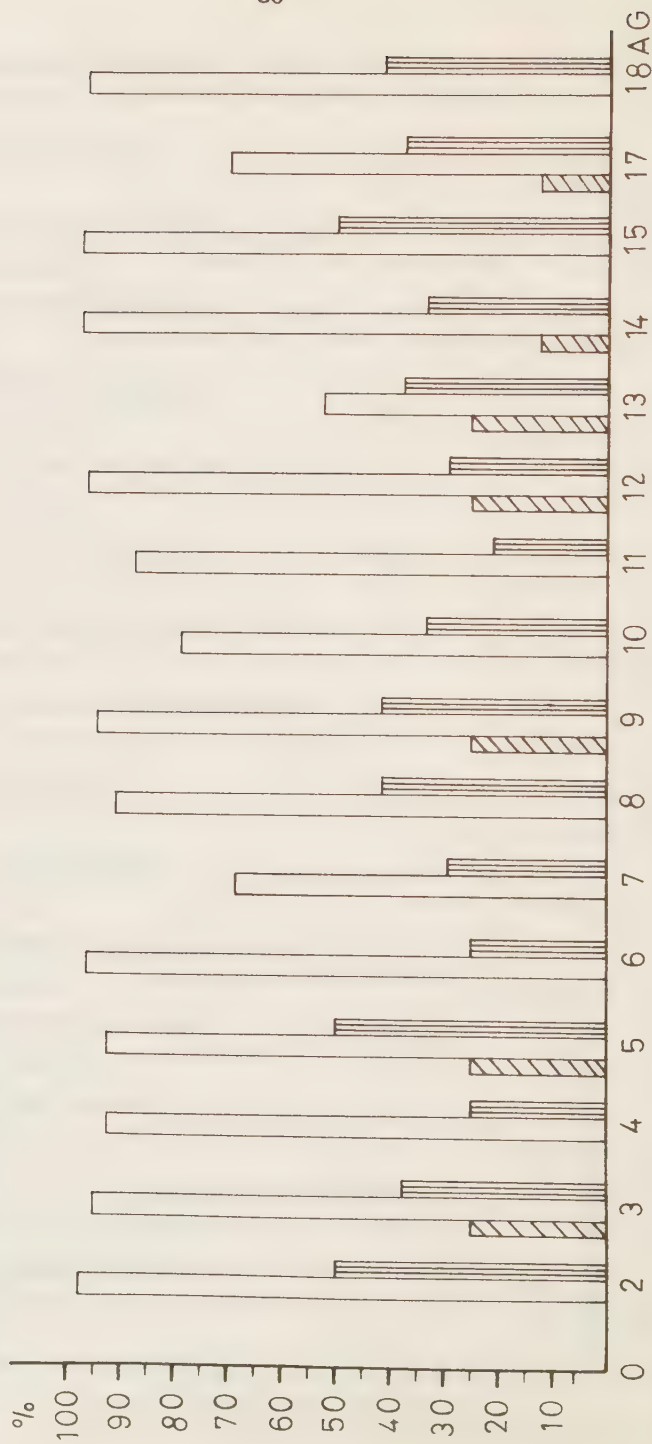
Antigenitätsuntersuchung

Antiserum gegen Antigen SA



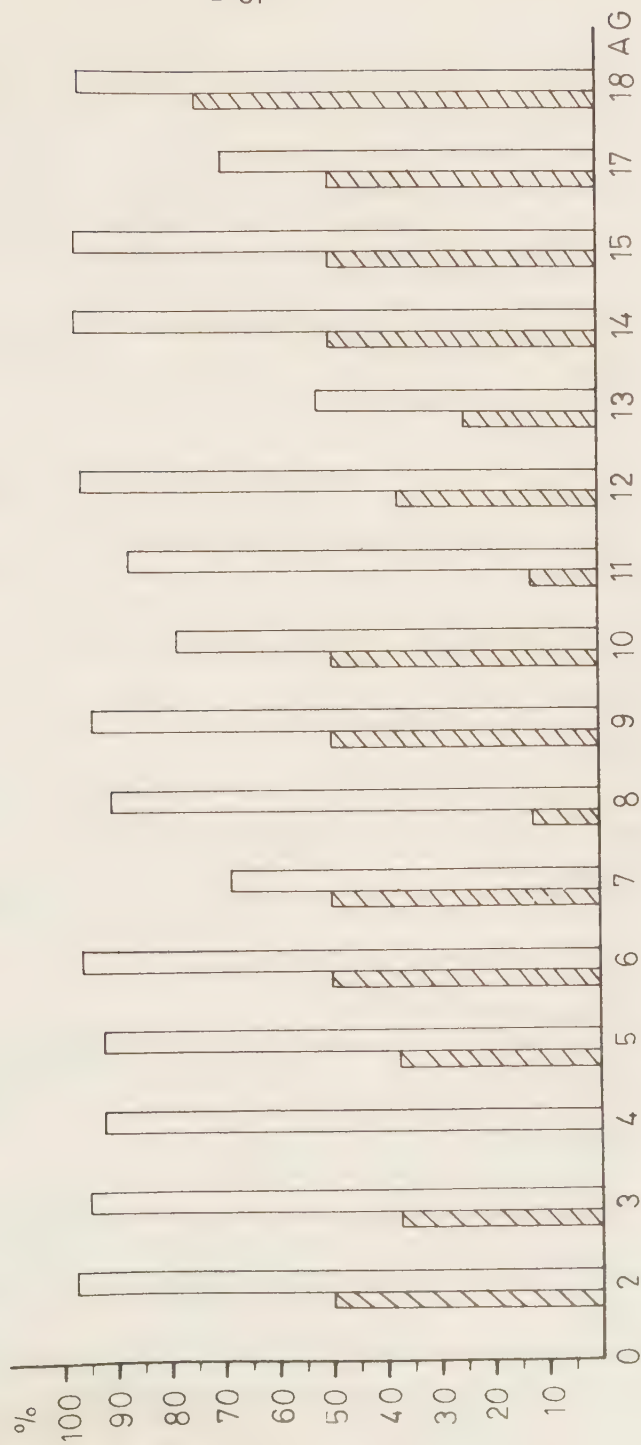
Zeichenerklärung siehe Abb. 1

Antiserum gegen Antigen Ca



Zeichenerklärung siehe Abb. 1

Antiserum gegen Antigen D



Zeichenerklärung siehe Abb. 1

Abb. 15

Antigenitätsuntersuchung

Antiserum gegen Antigen FN 5 D

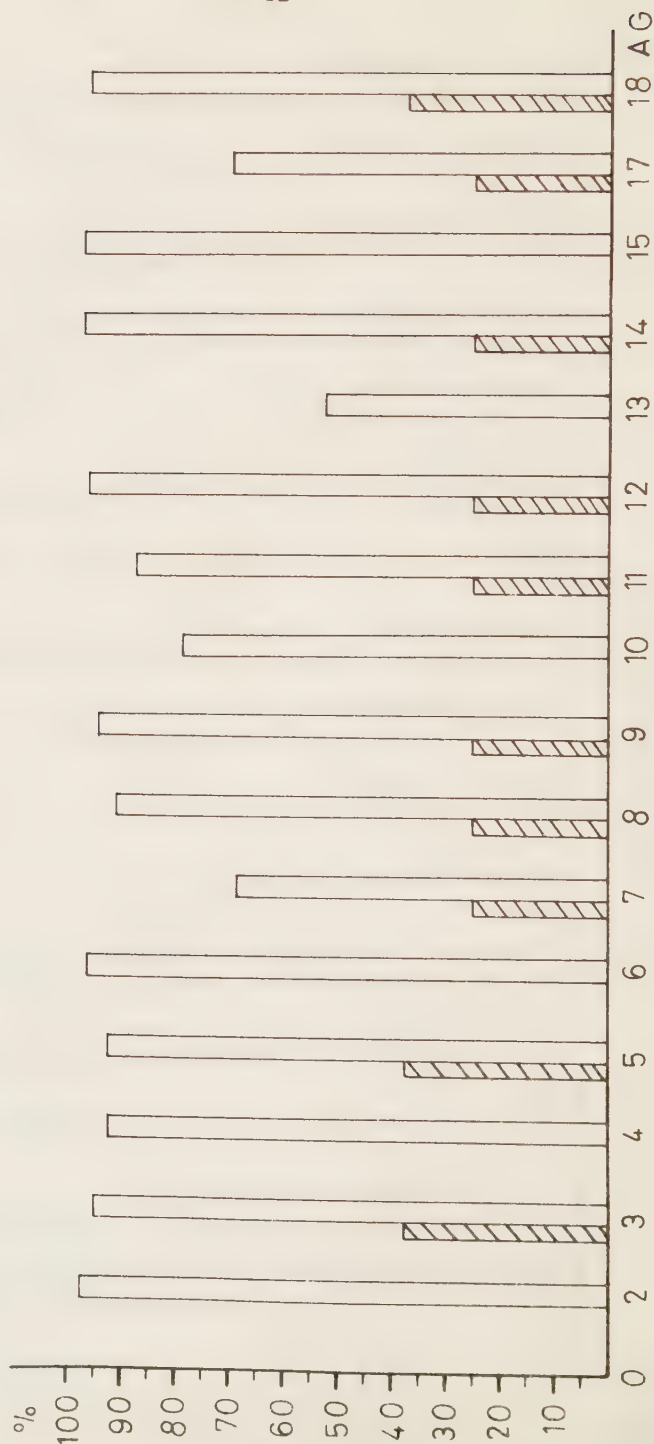
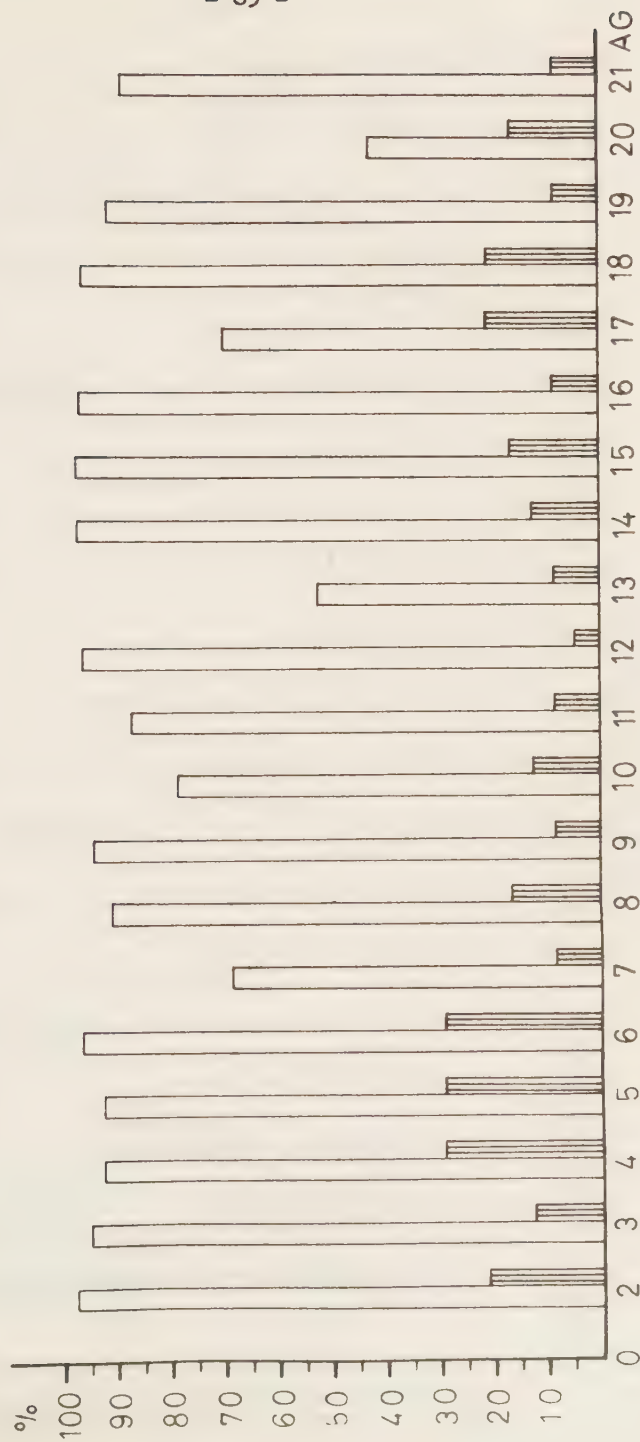


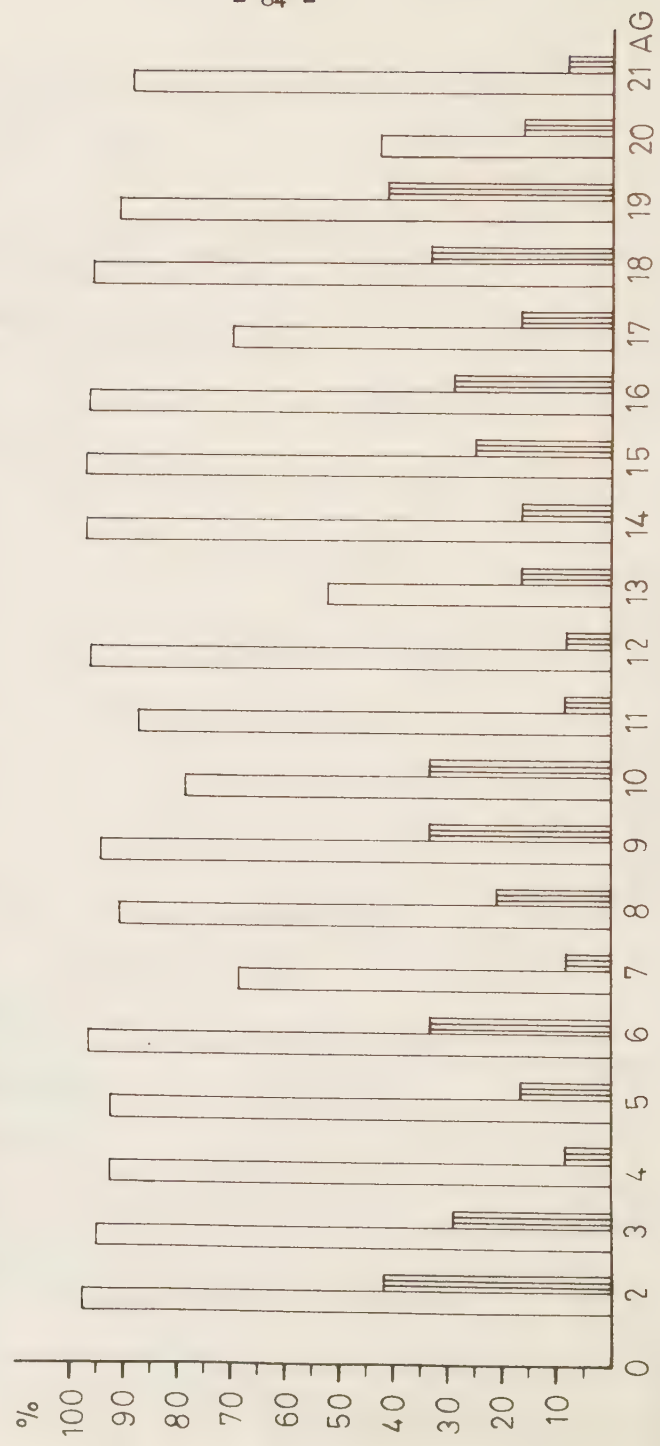
Abb. 16

Antigenitätsuntersuchung

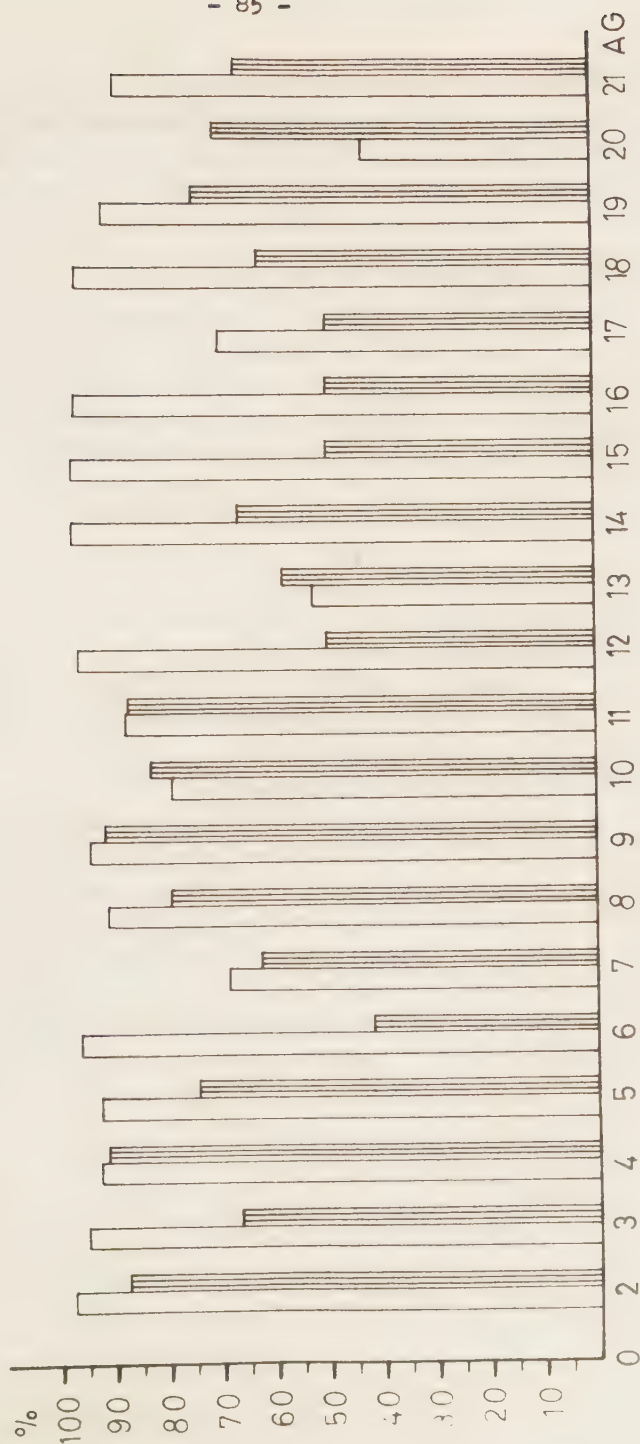
Antiserum gegen Antigen H



Antiserum gegen Antigen D



Antiserum gegen Antigen S



Zeichenerklärung siehe Abb. 1

Mit dem Präparat D (Abb. 14 u. 17) wurde je ein Kaninchen nach der Methode von KLUGE-WILM (64) und der nach HERRMANN (71) immunisiert. Dabei konnten mittels der Immunisierungsmethode ~~nach~~ KLUGE-WILM (64) die besseren Ergebnisse erzielt werden.

V. Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß mittels der indirekten Hämagglutination und Vergleich der serologischen Reaktionsergebnisse mit den Ergebnissen der Gesamteiweißbestimmungen der Extrakte

Das aufgrund der vorangegangenen Untersuchungsergebnisse entwickelte Extraktionsverfahren wurde mittels der indirekten Hämagglutination (IH) für den Nachweis von aME in Abhängigkeit vom Erhitzungseinfluß des Untersuchungsmaterials und des prozentualen Milcheiweißzusatzes überprüft.

1. Extraktgewinnung

30 g Material, aus dem Kern der Probe entnommen, wurden lyophilisiert. Für die Extraktion wurden 2 g Lyophilisat mit der 4 1/2 - fachen Menge phys. Kochsalzlösung, pH 7,2, versetzt und im Ultra-Turrax 30 Sekunden bei 20.000 U/min homogenisiert. Die homogenisierte Probe wurde 2 Stunden bei 40°C im Schüttelwasserbad extrahiert, anschließend 15 Minuten bei 3.000 U/min abzentrifugiert und filtriert. Ein Teil des Extraktes wurde für die Gesamteiweißbestimmung nach Biuret und ein Teil für die qualitative Milcheiweißbestimmung mittels der indirekten Hämagglutination (IH) verwendet. Untersucht wurden die auf 70°, 100°, 115° und 125°C (Kerntemperatur) erhitzten Wurstproben mit einem aME-Zusatz (Präparat FN 5 D) von 0,5, 1,0, 1,5 bzw. 2,0 %, berechnet auf den Fleisch-Fettanteil.

2. Durchführung der indirekten Hämagglutination (IH)

Die IH wurde mittels formalinisierten, sensibilisierter Erythrozyten durchgeführt (49). Hammelblut wurde zu gleichen Teilen in Alsever'scher Lösung aufgefangen und dreimal mit phys. Kochsalzlösung gewaschen. Das Erythrozytensediment wurde ca. 12 Stunden im Kühlschrank (4° bis 6°C) aufbewahrt. Für die Konservierung wurde eine 8 % ige Erythrozytenaufschwemmung zu gleichen Teilen mit einer 3 % igen Formalinlösung gemischt und 18 bis 20 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch viermal mit phys. Kochsalzlösung gewaschen, die gewaschenen formalinisierten Erythrozyten mit gepufferter phys. Kochsalzlösung zu einer 3,3 % igen Zellsuspension aufgeschwemmt und zu gleichen Teilen mit einer 1 : 40 000 verdünnten Tanninlösung versetzt. Die Aufschwemmung wurde 30 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert, anschließend zentrifugiert und das Sediment zweimal mit phys. Kochsalzlösung gewaschen. Das letzte Zentrifugat wurde mit gepufferter phys. Kochsalzlösung ($\text{pH } 6,4$) auf eine 3,3 % ige Zellsuspension verdünnt und für die Sensibilisierung zu gleichen Teilen mit einer 0,05 % igen aME-Lösung versetzt. Die Lösung wurde 12 Stunden bei 37°C unter ständigem Umrühren im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation wurden die formalinisierten und sensibilisierten Erythrozyten zentrifugiert, das Zentrifugat zweimal mit phys. Kochsalzlösung gewaschen und zu einer 10 % igen Suspension aufgeschwemmt. Diese Suspension wurde mit 4 % normalem Kaninchenserum sowie 10 % Saccharose in Ampullen abgefüllt, bei -60°C tiefgefroren und lichtgeschützt bei -18°C aufbewahrt.

Die IH wurde wie folgt durchgeführt:

In die Hämagglutinationsröhrchen (100 mal 14 mm) wurden 0,5 ml phys. Kochsalzlösung vorgelegt. Vom mit dem fraglichen Extrakt voradsorbierten Antiserum wurden 0,5 ml zu einer geometrischen Verdünnungsreihe überpipettiert. Zu dieser Verdünnung wurden je Röhrchen 2 Tropfen (1 ml Pi-

pette) einer 2,5 % igen Aufschwemmung der formalinisierten, sensibilisierten Erythrozyten zugegeben. Nach gründlicher Durchmischung wurden die Röhrchen 2 Stunden bei Zimmertemperatur stehengelassen und anschließend die Reaktion abgelesen. Für die Untersuchungen wurde je eine positive sowie negative Serumkontrolle angesetzt.

Die Beurteilung der Reaktion erfolgt durch das Betrachten der Sedimente am Boden der Röhrchen mit Hilfe eines um 45° geneigten Spiegels. Bei eingetretener, also positiver Hämagglutination, haben sich die Erythrozytensedimente teppich- bzw. schleierartig über den Boden des Röhrchens ausgebreitet (negativer Antigennachweis).

Bei negativer Hämagglutination sedimentieren die Erythrozyten in den tiefsten Punkt des Röhrchens und füllen eine engumgrenzte Zone aus (positiver Antigennachweis).

3. Ergebnisse

In den Tab. 11 und 12 sind die Untersuchungsergebnisse zusammengefaßt.

Wie aus Tab. 11 ersichtlich wird, stieg der mittels Biuretreaktion bestimmte Gesamteiweißgehalt bei den einzelnen Milcheiweißkonzentrationen mit der Erhöhung der Temperatur an und erreichte bei den auf 100°C erhitzten Modellchargen bei einem 1,5 % igen aME-Zusatz und bei den auf 115°C erhitzten Chargen bei einem 0,5, 1,0 und 2,0 % igen aME-Zusatz sein Maximum, um dann wieder bei weiterer Erhöhung der Temperatur auf 125°C abzusinken. Innerhalb einer Erhitzungstemperatur konnte trotz steigender Milcheiweißkonzentration keine eindeutige Erhöhung des Gesamteiweißgehaltes nachgewiesen werden, so daß vom Gesamteiweißgehalt der Extrakte nicht auf den Zusatz an aME geschlossen werden konnte. Mit Hilfe des beschriebenen Extraktionsverfahrens konnte jedoch auch bei Sterilisationstemperaturen von 115° sowie 125°C aME extrahiert werden.

Tab. 11

Gesamteiweißbestimmung verschiedener Extrakte

mittels der Biuretreaktion in mg pro ml

Extraktionsmittel: phys. Kochsalzlösung pH 7,2

Extraktionsdauer : 2 Std. im Wasserschüttelbad bei 40°C

Das Untersuchungsmaterial wurde lyophilisiert und anschließend im Ultra-Turrax homogenisiert.

	70°C	100°C	115°C	125°C
0,5 %	1,29	1,94	2,81	1,89
1,0 %	1,23	1,39	2,45	2,11
1,5 %	1,56	1,77	1,56	1,45
2,0 %	1,29	1,82	1,83	1,5

Tab. 12

Bestimmung des Milcheiweißgehaltes verschiedener Extraktlösungen

mit Hilfe der indirekten Hämagglutination

	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16364	32728	65456
pos. Serum- kontrolle	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++
neg. Serum- kontrolle	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AMF-Konzen- trationen	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++
0,5 % , 70°C	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	-
1,0 % , 70°C	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-
1,5 % , 70°C	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-
2,0 % , 70°C	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-
0,5 % , 100°C	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-
1,0 % , 100°C	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-
1,5 % , 100°C	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-
2,0 % , 100°C	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-
0,5 % , 115°C	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-
1,0 % , 115°C	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-
1,5 % , 115°C	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-
2,0 % , 115°C	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-
0,5 % , 125°C	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-
1,0 % , 125°C	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-
1,5 % , 125°C	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-
2,0 % , 125°C	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-

Inwieweit zwischen dem aME-Zusatz der Modellchargen und dem aME-Gehalt in den Extraktionslösungen, in Abhängigkeit zur Konzentration und Hitzebelastung, eine Korrelation zum Gesamteiweißgehalt besteht, sollte mittels der IH überprüft werden.

aME konnte mittels der IH bei allen Modellchargen nachgewiesen werden. Innerhalb einer Temperaturstufe kam es in Abhängigkeit zur aME-Konzentration in den Modellchargen zur Hämagglutinationshemmung. Die bei den Modellchargen mit einem 0,5 bzw. 1,0 % igen aME-Zusatz beobachtete Zunahme des Hämagglutinationshemmungstiters bei Temperatureinflüssen bis auf 115°C und die bei weiterer Temperaturerhöhung auf 125°C beobachtete Abnahme des Hämagglutinationshemmungstiters entspricht den Ergebnissen der Gesamteiweißbestimmung der Extrakte.

Bei den Modellchargen mit einem Zusatz von 1,5 bzw. 2,0 % aME wurde bei den bis auf 125°C erhitzten Proben der höchste Hemmungstiter beobachtet.

D. D I S K U S S I O N

Alle untersuchten aME-Präparate entsprachen den gesetzlichen Anforderungen der Fleisch-VO (19) für aME. Im Durchschnitt wurden für den Gehalt an Rohprotein 86,33, für Wasser 7,5, für Fett 0,12, für Asche 5,13 und für ONF (organisches Nichtfett) 87,24 % bestimmt. Wie aufgrund der Ergebnisse aus der Vollanalyse der Präparate (Tab. 2) deutlich wurde, wiesen die handelsüblichen aME-Präparate im Rohproteingehalt Unterschiede bis zu 8 % auf. Die qualitativen Unterschiede zwischen den einzelnen Präparaten lassen sich einmal auf die Verwendung unterschiedlichen Ausgangsmaterials sowie Herstellungsprozesse zurückführen und zum anderen mit Zusätzen wie Dickungsmittel, Kohlenhydraten und Ascorbinsäure, welche z. T. vom Hersteller deklariert wurden, erklären.

Bei der Bestimmung der Löslichkeit der Präparate in phys. Kochsalzlösung und Aqua dest. (Tabb. 3 und 4) ergab sich bei nicht erhitzten Lösungen in phys. Kochsalzlösung im Durchschnitt eine Löslichkeit von 86,1 % und in Aqua dest. eine Löslichkeit von 92,3 %. Weit unter dem Mittel lag die Löslichkeit der in phys. Kochsalzlösung und Aqua dest. gelösten Präparate HM (67,6; 71,5 %), M (40,6; 50,1 %) sowie SK (42,0; 48,0 %). Bei diesen Präparaten betrug die Löslichkeitsdifferenz zum ermittelten Durchschnitt in phys. Kochsalzlösung 21,5; 52,9 bzw. 51,2 % und in Aqua dest. 22,4; 45,9 bzw. 48,2 %. Die signifikante Einschränkung der Löslichkeit dieser Präparate läßt sich nicht auf die unterschiedliche Herstellung der Präparate zurückführen. Bei den Präparaten HM und SK handelt es sich um ein Walz Na-Kaseinat, während das Präparat M als Sprühprodukt eine Mischung von Na- und Ca-Kaseinat darstellt. Der Einfluß des Ausgangsmaterials Milch auf das Löslichkeitsgeschehen ließe sich nur beim Präparat HM nachweisen. Das Präparat HM wird aus hochoerhitzter Milch als Walz Na-Kaseinat hergestellt.

Das durchschnittliche Löslichkeitsvermögen der Präparate in

Aqua dest. (Tab. 3) bleibt bis zu einer Temperatureinwirkung von 100°C konstant und nimmt mit zunehmender Temperatureinwirkung bis auf 125°C ab. Bei den in phys. Kochsalzlösung gelösten Präparaten (Tab. 4) ist die durchschnittliche Löslichkeit bis zu einer Temperatureinwirkung von 90°C konstant und sinkt dann mit zunehmender Temperatureinwirkung bis auf 125°C proportional ab. Die ab hohen Sterilisationstemperaturen beobachtete Senkung der Löslichkeit ist auf eine Denaturierung und bei Erhitzung auf 125°C z.T. sogar auf eine Gerinnung des aME zurückzuführen. Die Untersuchungsergebnisse bestätigen die in der Literatur (7,58,108) gemachten Angaben, daß die aME-Präparate im Gegensatz zu anderen Proteinen äußerst hitzestabil und widerstandsfähig gegen eine Denaturierung sind. Beim Vergleich des Löslichkeitsvermögens der Präparate in Aqua dest. und phys. Kochsalzlösung lag die Löslichkeit in Aqua dest. im Durchschnitt um 6 % höher als in phys. Kochsalzlösung.

Bei der Beurteilung der Temperatureinwirkung auf die Löslichkeit der Präparate in Aqua dest. ließ sich bei den Präparaten HM und D keine Temperaturabhängigkeit zum Löslichkeitsverhalten nachweisen, während die Löslichkeit von Präparat M mit steigender Temperatur zunahm und nach einer Temperatureinwirkung ab 115°C besonders deutlich wurde. Dieser Effekt war besonders bei Präparat SK zu beobachten. Hier wurde die Korrelation zwischen Löslichkeitsvermögen und Temperatureinwirkung eindeutig sichtbar: Je höher die Temperatureinwirkung war, desto besser war auch die Löslichkeit. Bei diesen Präparaten konnte bis zu den angewendeten Temperatureinwirkungen keine Denaturierung des Eiweißes beobachtet werden. Die Präparate sind besonders für die Verarbeitung von Vollkonserven geeignet, da sie auch bei hohen Sterilisationstemperaturen ihr Emulgiervermögen nicht verlieren.

Bei der Bestimmung der Löslichkeit in phys. Kochsalzlösung zeigt das Präparat SK bis zu einer Temperatureinwirkung von

115°C den gleichen Effekt wie bei seiner Löslichkeitsbestimmung in Aqua dest. Dagegen kam es nach einer Temperatureinwirkung von 125°C zu einer deutlichen Abnahme der Löslichkeit. Eine kontinuierliche Löslichkeit zeigte auch das Präparat HM bis zu einer Temperatureinwirkung von 100°C. Bei einer Temperatureinwirkung von 115°C kam es zum deutlichen Absinken der Löslichkeit, die aber nach einer Temperatureinwirkung von 125°C wieder zunahm. Bei Präparat M dagegen blieb das Löslichkeitsverhalten bis 70°C gleich. Bei den Temperatureinwirkungen von 80° bis auf 115°C wurde eine deutliche Lösungseinschränkung beobachtet, die aber nach einer Temperatureinwirkung von 125°C wieder aufgehoben wurde. Ein gleichbleibendes Löslichkeitsverhalten zeigt auch Präparat D bis zu einer Temperatureinwirkung von 80°C, während nach zunehmendem Temperatureinfluß eine kontinuierliche Abnahme der Löslichkeit zu beobachten war.

Der Unterschied im Lösungsverhalten der untersuchten Präparate zwischen Aqua dest. und phys. Kochsalzlösung nach Temperatureinwirkung ist wahrscheinlich auf den Einfluß der Elektrolyte zurückzuführen, so daß vermutet werden kann, daß es bei Verwendung von phys. Kochsalzlösung als Lösungsmittel zu einer stärkeren Elektrolytverschiebung als beim Lösungsmittel Aqua dest. kommt.

Die in den Tab. 5 und 6 zusammengefaßten Ergebnisse der Gesamteiweißbestimmungen der "2 % igen aME-Lösungen" in Aqua dest. und phys. Kochsalzlösung unterstreichen die Ergebnisse der Löslichkeitsbestimmungen (Tab. 3 und 4). Der Gesamteiweißgehalt der durchschnittlich zu 80 bis 95 % gelösten Präparate in Abhängigkeit vom Lösungsmittel und Temperatureinwirkung beträgt im Durchschnitt ca. 60 bis 65 %, so daß beim Ansatz einer 2 % igen aME-Lösung in Wirklichkeit nur etwa 1,2 bis 1,3 % Gesamteiweiß in Lösung gehen.

Die Untersuchungsergebnisse der Gesamteiweißbestimmungen reiner Milcheiweißlösungen machen deutlich, daß auch bei

Verwendung einer optimalen Extraktionsmethode aME aus Fleischerzeugnissen nicht absolut extrahiert werden kann und bestenfalls ca. 60 % des tatsächlich erfolgten Zusatzes nachgewiesen werden können. Das würde bei einem Zusatz von 2 % aME, berechnet auf den Fleisch - Fettanteil, bedeuten, daß bei Zugrundelegung des Mindestgehaltes an Eiweiß i.T. nach der Fleisch-VO von 83 % von 1,66 % Milcheiweiß nur ca. 70 %, d. h. 1,16 % Milcheiweiß, erfaßt werden könnten.

In der Literatur wird eine Anzahl von Methoden zur Extraktion von Fremdeiweißen aus hocherhitzten Fleischerzeugnissen beschrieben (14,15,23,24,25,27,30,46,76,91,92,127). Wie aus der Literatur deutlich wird, konnte mit allen diesen Extraktionsverfahren genügend Fremdeiweiß dargestellt werden, so daß der serologische Nachweis der Fremdeiweiße geführt werden konnte.

Aus den Ergebnissen der Gesamteiweißbestimmungen der Extrakte kann nicht direkt auf den Gehalt an Fremdeiweiß geschlossen werden, da bei der Extraktion von Fremdeiweiß aus Fleischerzeugnissen neben Fremdeiweiß auch andere Proteine des Produktes in Lösung gehen. Trotzdem wurde für die Beurteilung der beschriebenen Extraktionsverfahren die Gesamteiweißbestimmung der Extrakte als Bezugspunkt diesen Untersuchungen zugrunde gelegt, da besonders bei der Extraktion von aME aus hocherhitzten Fleischerzeugnissen im Extrakt der Anteil an anderen Proteinen zurückgeht bzw. ganz verschwindet.

Wie die Untersuchungsergebnisse aus Tab. 7 verdeutlichen, wurden unabhängig vom Zerkleinerungsgrad des Untersuchungsmaterials stets bei der Extraktion unter anhaltender Bewegung bzw. durch Rühren auf dem Magnetrührer bessere Extraktionsergebnisse erzielt. Durch stetiges Aufwirbeln des Extraktionsgemisches wurde ein inniger Kontakt zwischen

Untersuchungsmaterial und Extraktionsmittel hergestellt und somit günstigere Milieubedingungen für das Inlösungsgehen des Eiweißes geschaffen. Begünstigt wurde das Inlösungsgehen des Eiweißes außerdem entscheidend durch die Vorbehandlung und Zerkleinerung des Untersuchungsmaterials. In den Extrakten aus lyophilisiertem und anschließend homogenisiertem Material wurden die höchsten Eiweißgehalte bestimmt. Damit wurden die Untersuchungsergebnisse von HERRMANN (47,77), die durch vorherige Lyophilisation des Untersuchungsmaterials die Ergebnisse für den serologischen Nachweis von aME in hocherhitzten Fleischerzeugnissen unter Verwendung der in der Literatur beschriebenen Extraktionsmethoden eindeutig verbessern konnte, im Gegensatz zu den Untersuchungsergebnissen von DEGENKOLB u. HINGERLE (14), KLUGE-WILM (64) sowie GERIGK u. KRÜGER (27), bestätigt. Durch Lyophilisation wird das Eiweiß in einen geeigneteren Lösungszustand gebracht, der mit einer Vergrößerung der Lösungsoberfläche verbunden ist (126). Durch das Zusammenspiel mit einer sehr intensiven Zerkleinerung des Untersuchungsmaterials wird die Größe der Oberfläche, an der das zu lösende Eiweiß aus dem Untersuchungsmaterial in das Extraktionsmittel übergehen kann, bestimmt. Stetiges Aufwirbeln des Extraktionsgemisches begünstigt diesen Effekt. Dagegen halten GERIGK u. KRÜGER (27) die alleinige Homogenisierung im Ultra-Turrax als Voraussetzung für den Übertritt des Fremdeiweißes in das Lösungsmittel für ausreichend.

Bei den durch Lyophilisation getrockneten Wurstproben bezieht sich der ermittelte Fremdeiweißgehalt des Extraktes auf das Trockengewicht des Fleisch - Fettanteils der Probe. Damit kann bei einer quantitativen Aussage der Wassergehalt eines Fleischerzeugnisses unberücksichtigt bleiben. Für eine quantitative Bestimmung des Fremdeiweißgehaltes aus frischen Fleischerzeugnissen ist eine Fett- und Wasserbestimmung notwendig, da Vorbehandlung und Alterung des Pro-

benamaterials dem Untersucher unbekannt sind. Der Vorwurf, daß aufgrund des Zeitaufwandes die endgültige Beurteilung der Probe durch die Lyophilisation vor der Extraktion um mindestens einen Tag verzögert wird, wird durch die dann notwendige Fett- und Wasserbestimmung aufgehoben. Außerdem sollte grundsätzlich die Leistungsfähigkeit einer Methode höher bewertet werden als "die Anforderung der Praxis unter dem Aspekt der Verhältnismäßigkeit der Mittel " (27).

Bei den in der Literatur beschriebenen Extraktionsanleitungen wird als Lösungsmittel phys. Kochsalzlösung bzw. Veronalpuffer zur Extraktion verwendet. In eigenen Untersuchungen wurde die Eignung von phys. Kochsalzlösung mit unterschiedlichem pH (6,5; 7,2; 8,6) im Extraktionsgemisch zur Extraktion von Eiweiß geprüft. Außerdem wurde auch Veronalpuffer, pH 8,6, als Extraktionsmittel eingesetzt (Tab. 8).

Bei Verwendung von phys. Kochsalzlösung mit einem pH von 6,5 bzw. 7,2 wurden durchschnittlich die höchsten Gesamteiweißgehalte im Extrakt bestimmt. Aus arbeitstechnischen Gründen wurde, da sich beim Vergleich der beiden Lösungsmittel kein deutlicher Unterschied im Gesamteiweißgehalt der Extrakte zeigte, der phys. Kochsalzlösung mit einem pH von 7,2 der Vorzug gegeben. GERIGK u. KRÜGER (27) stellten in ihren Untersuchungen fest, daß bei einer Extraktion von aME die phys. Kochsalzlösung dem Veronalpuffer gleichwertig sei, sofern die Extraktion am oder über dem Neutralpunkt stattfände. STUTZ-BAASCH (133) gibt dagegen als Extraktionsmittel Veronalpuffer den Vorzug. Die von KLUGE-WILM (64) sowie SINELL u. KLUGE-WILM (127) erreichte Verbesserung der Extraktion von aME aus Fleischerzeugnissen durch Zugabe von kochendem Veronalpuffer bzw. kochender phys. Kochsalzlösung konnte STUTZ-BAASCH (133) nicht bestätigen. Bei Verwendung dieser kochenden Extraktionsmittel konnte sie keine signifikante Erhöhung der Gesamteiweißgehalte in den Extraktionslösungen ermitteln.

In einer weiteren Versuchsanordnung wurden drei Extraktionsverfahren auf ihre Eignung in Abhängigkeit zur Extraktionszeit und -temperatur geprüft und verglichen. Wie aus den Ergebnissen der Tab. 9 ersichtlich wird, läßt sich bei der Extraktion von aME aus den Modellchargen bei Zimmertemperatur eindeutig eine Abhängigkeit der Gesamteiweißgehalte der Extrakte von der Extraktionszeit erkennen. Hier konnten erst nach 24-stündiger Extraktion die höchsten Gesamteiweißgehalte in den Extrakten nachgewiesen werden, während bei der Extraktion im Schüttelwasserbad bei 40°C bereits nach 2 Stunden das Extraktionsoptimum erreicht worden war, und nach 3-stündiger Extraktion keine Verbesserung der Extraktionsergebnisse mehr beobachtet werden konnte. Bei der Extraktion im Brutschrank bei 37°C war im Durchschnitt das Extraktionsmaximum mit Ausnahme der Extrakte aus bis auf 100°C erhitztem Probenmaterial, wo das Extraktionsmaximum erst nach 3 Stunden zu beobachten war, bereits nach 2 Stunden erreicht.

Da bereits nach 2-stündiger Extraktion im Schüttelwasserbad bei 40°C das Extraktionsoptimum für aME erreicht werden konnte, wurde aus arbeitstechnischen Gründen dieser Extraktion in den weiteren Versuchsanordnungen der Vorzug gegeben.

Um festzustellen, inwieweit die Extraktionsmittelmenge auf die Untersuchungsergebnisse der Gesamteiweißgehalte der Extrakte Einfluß hat, wurden dem Untersuchungsmaterial das Extraktionsmittel phys. Kochsalzlösung mit einem pH von 7,2 in Mengen von 7, 8, 9, 10, 11 und 13 ml jeweils zu 5 g lyophilisiertem Probenmaterial zugesetzt (Tab. 10). Bei der Zugabe von 7 bzw. 9 ml Extraktionsmittel zu 5 g Probenmaterial ließen sich die höchsten Gesamteiweißgehalte in den Extrakten nachweisen. Durch diese Zusätze wurde ein Lösungsverhältnis: Probenmaterial zu Extraktionsmittel von 1 : 1,4; 1 : 1,6; 1 : 1,8; 1 : 2,0; 1 : 2,6 geschaffen. Bei Zugabe von 7 ml Lösungsmittel zu 5 g Probenmaterial konnte zwar mit der höchste Gesamteiweißgehalt

bestimmt werden, doch ließ sich nur eine geringe Extraktmenge gewinnen. Ein optimales Verhältnis zwischen Lösungsmittel und Probenmaterial wurde bei der Zugabe von 9 ml Lösungsmittel beobachtet. Auch wurde bei diesem Lösungsverhältnis 1 : 1,8 die Relation vom Gesamteiweißgehalt der Extrakte zum Fremdeiweißgehalt im Probenmaterial in etwa deutlich. Diese Extraktionsmittelvorgabe von 9 ml stimmt im wesentlichen mit der von DEGENKOLB u. HINGERLE (14) entwickelten Formel $4(4a + 1b) - 10 = \text{ml Extraktionsmittel}$ überein. Für die Extraktion bedeutet das, daß zu 5 g Frischgewicht des Untersuchungsmaterials die 1,8-fache und zu 2 g lyophilisiertem Untersuchungsmaterial die 4,5-fache Menge Extraktionsmittel vorgelegt werden muß.

Aufgrund der Untersuchungsergebnisse wird für die optimale Extraktion von aME aus erhitzten Fleischerzeugnissen folgende Extraktionsmethode vorgeschlagen:

30 g Untersuchungsmaterial, aus dem Kern der Probe entnommen, werden lyophilisiert. Für die Extraktion werden 2 g Lyophilisat mit der 4 1/2-fachen Menge phys. Kochsalzlösung, pH 7,2, versetzt und im Ultra-Turrax 30 Sekunden bei 20.000 U/min homogenisiert. Die homogenisierte Probe wird 2 Stunden bei 40°C im Schüttelwasserbad extrahiert und anschließend 15 Minuten bei 3.000 U/min abzentrifugiert. Der opaleszierende Überstand wird für den serologischen Nachweis weiter verwendet.

Da die Beschaffenheit der Extrakte für die verschiedenen zur Anwendung kommenden serologischen Untersuchungsmethoden von großer Bedeutung ist, muß die Aufbereitung der Extrakte entsprechend erfolgen. Das setzt voraus, daß für Präzipitationsreaktionen in flüssigen Medien der Extrakt keine Trübungen aufweisen darf. Durch entsprechende Filtrationen kann zwar die Trübung der Extrakte beseitigt werden, gleichzeitig kommt es aber zu einer Verringerung des Gesamteiweißgehaltes im Extrakt. Die Beobachtungen haben auch GERIGK u. KRÜGER (27) bei ihren Untersuchungen gemacht. Da bei der

Extraktion von Fremdeiweiß aus Fleischerzeugnissen die Extrakte zum Großteil mehr oder weniger stark getrübt sind, empfiehlt es sich, allgemein für den Nachweis von Fremdeiweißen in Fleischerzeugnissen serologische Untersuchungsmethoden anzuwenden, die eine Verwendung getrübter Extrakte gestatten.

Bei der Prüfung der untersuchten aME-Präparate auf ihre Antigenität konnte nachgewiesen werden, daß nicht alle Präparate im gleichen Maße zur Immunisierung geeignet sind. Die durch Immunisierung mit "komplexen" Antigenen gewonnenen Antiseren nach HERRMANN (71) reagierten mit allen Präparaten eindeutig positiv, während einige nach der Immunisierungsmethode nach KLUGE-WILM (64) hergestellten Antiseren nicht mit allen aME-Präparaten positiv bzw. negativ reagierten. Wie die Untersuchungen zeigten, hängt die Antigenität der Präparate nicht von ihrer Löslichkeit ab. Bei den Präparaten GS (Abb. 7), EM-6 (Abb. 1) sowie SMB (Abb. 10) wurde im Gegensatz zu den Präparaten Ca (Abb. 13), RM (Abb. 5) und FN 5 D (Abb. 15) eine stärkere Antigenität beobachtet.

Die bei der Durchführung der Agar-Gel-Diffusion festgestellte Antigen-Antikörper-Reaktion war stets mit Antiseren, die durch Doppelimmunisierung nach KLUGE-WILM (64) sowie HERRMANN (71) gewonnen worden waren, deutlich stärker ausgeprägt als die mittels einfacher Immunisierung gewonnenen Antiseren.

Jedes Antigen kann eine "Vielheit" von Antikörpern erzeugen, so daß bei der Arbeit mit "komplexen" Antigenen, wie sie bei den aME-Präparaten vorliegen, stets mit einer großen "Vielheit" von Antikörpern zu rechnen ist. Es ist anzunehmen, daß es aufgrund der Doppelimmunisierung nach KLUGE-WILM (64) und HERRMANN (71) und der somit erfolgten Hyperimmunisierung zu einer besonders starken Antikörperbildung kommt.

Beim Vergleich zwischen den beiden Immunisierungsmethoden wurde deutlich, daß bei der Immunisierung mit aME kein

signifikanter Unterschied bezüglich der Antigenität besteht. Bei der Immunisierung nach HERRMANN (71) reagierte das Antiserum gegen das Präparat S (Abb. 18) mit allen geprüften Präparaten sehr deutlich, während das mit dem Präparat D (Abb. 14 u. 17) mittels der Immunisierung nach KLUGE-WILM (64) gewonnene Antiserum bessere Ergebnisse als das mittels der Immunisierung nach HERRMANN (71) gewonnene Antiserum in der Agar-Gel-Diffusion zeigte. Grundsätzlich konnte nachgewiesen werden, daß alle Antiseren, die durch Immunisierung mit "komplexen" Antigenen gewonnen worden waren, eindeutig mit jedem der geprüften Präparate positiv in der Agar-Gel-Diffusion reagierten.

Mit den Untersuchungen konnten die Angaben von HERRMANN (48) bestätigt werden, wonach die durch Immunisierung mit "komplexen" Antigenen gewonnenen Antiseren mit allen handelsüblichen Präparaten positiv reagierten, während bei der Prüfung der handelsüblichen Antiseren der Behring-Werke gegen aME diese mit einzelnen Präparaten keine positive serologische Reaktion bildeten.

Nach AURAND, BROWN u. LECCE (2) soll nur die α -Fraktion des Kaseins Antikörper bilden. Wird das α -Kasein in der Immunelektrophorese mit kompletten Antimilcheiweißseren geprüft, so bildet die α -Kaseinfraktion allein drei Präzipitate (32, 34, 35). Aus vielen Arbeiten der einschlägigen Literatur ist bekannt, daß Antikörper oft eine erstaunliche Spezifität aufweisen, die sie befähigt, selbst bei sehr geringfügigen Abweichungen im räumlichen Aufbau, diese noch zu unterscheiden. Somit dürfte die alleinige Antikörperbildung der α -Fraktion des Kaseins widerlegt sein. Die von GÜNTHER (31) gemachte Beobachtung, daß Kaseine relativ schlechte Antikörperbildner seien, kann selbst unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Eignung der Serumpender zur Antikörperbildung aufgrund der Untersuchungen nicht bestätigt werden. Grundsätzlich konnten mit allen zur

Immunisierung verwendeten Präparaten Antikörperbildung bei den Serumspendern beobachtet werden. Aufgrund der Antigenitätsunterschiede zwischen den einzelnen aME-Präparaten ist es jedoch notwendig, zur Immunisierung gegen aME ein Präparat zu wählen, das sich besonders zur Antikörperbildung im Serumspender eignet. Zur Immunisierung geeigneter Serumspender sind die aME-Präparate GS bzw. S besonders geeignet.

Die in Tab. 11 zusammengefaßten Untersuchungsergebnisse bestätigen, daß aME gegenüber Temperatureinflüssen sehr widerstandsfähig ist. Mit zunehmender Temperatur wurde in den Extrakten aus den mit 0,5, 1,0 und 2,0 % aME versetzten Modellchargen bei einem Temperatureinfluß bis zu 115°C die höchsten Gesamteiweißgehalte bestimmt, die dann jedoch bei einer weiteren Temperaturerhöhung bis auf 125°C wieder absanken. Die Extraktionsergebnisse aus den Modellchargen bestätigen die bei reinen Milcheiweißlösungen in Aqua dest. und phys. Kochsalzlösung beobachteten Einflüsse der Temperatur (Tabb. 3 u. 4). Während jedoch bei der Bestimmung der Gesamteiweißgehalte (Tabb. 5 u. 6) der 2 % igen aME-Lösungen in phys. Kochsalzlösung und Aqua dest. eine Verringerung des Proteingehaltes bereits zwischen 90° und 115°C zu beobachten war, kommt es bei der Gesamteiweißbestimmung der Extrakte aus den Modellchargen erst nach einer Erhitzung über 115°C zu einem deutlichen Gesamteiweißverlust.

Diese Untersuchungsergebnisse verdeutlichen erneut, daß insbesondere bei der Vielzahl der auf dem Markt befindlichen Fremdeiweißpräparate zur quantitativen Fremdeiweißbestimmung in Wurstproben nicht Meßwerte verwendet werden können, die an reinen Antigenverdünnungen ermittelt worden sind. Die Untersuchungsergebnisse aus den Tabb. 5 u. 6 sowie Tab. 11 zeigen, daß die Temperaturempfindlichkeit der aME-Lösungen in Aqua dest. bzw. phys. Kochsalzlösung stärker ist als die von aME in Fleischerzeugnissen. Wie bereits SINELL (127)

festgestellt hat, kann aufgrund des Gesamteiweißgehaltes der Extrakte nicht auf den Gehalt an Fremdeiweißen in den Fleischerzeugnissen geschlossen werden, da die Extrakte nicht nach ihrem "Antigenstickstoff", sondern nach dem in der Biuretreaktion faßbaren Gesamteiweißgehalt beurteilt werden. Trotzdem kann bei der Gesamteiweißbestimmung der Extrakte besonders aus Untersuchungsmaterial, das über 90°C erhitzt worden ist, angenommen werden, daß der ermittelte Rohproteingehalt in der Hauptsache auf das extrahierte aME zurückgeführt werden kann, da mit zunehmendem Temperatureinfluß die anderen Proteine der Fleischerzeugnisse koaguliert bzw. bereits denaturiert sind und somit nicht mehr extrahiert werden können. Die in Tab. 12 zusammengefaßten Untersuchungsergebnisse zeigen, daß aME mittels der indirekten Hämagglutination unter Verwendung von formalinisierten, sensibilisierten Hammelerythrozyten auch bei Modellchargen, die bis auf 125°C erhitzt worden waren, nachgewiesen werden konnte. Die Zunahme der Hämagglutinationshemmung innerhalb einer Milcheiweißkonzentration, besonders bei den auf 70°, 100° und 125°C erhitzten Modellchargen, untermauert die Untersuchungsergebnisse der Gesamteiweißbestimmung in den Extrakten. Die bei Modellchargen, die bis auf 125°C erhitzt worden waren, beobachtete starke Hämagglutinationshemmung ist mit großer Wahrscheinlichkeit auf die durch die starke Temperatureinwirkung hervorgerufene Konfigurationsänderung der Proteinmoleküle zurückzuführen, so daß nur noch die Antigene mit den Antikörpern reagieren können, deren Konfiguration mit der der Antikörper vollständig übereinstimmt.

E. ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Literatur über die gesetzlichen Bestimmungen für die Verarbeitung von aME in Fleischerzeugnissen, die technologische Bedeutung sowie die physikalisch - chemischen Eigenschaften des aME wurde zusammengestellt und besprochen. Außerdem wurden Extraktionsverfahren, Antigenaufbereitung, Immunisierung, Serumgewinnung sowie Nachweismethoden für aME in Fleischerzeugnissen erörtert.
2. 22 handelsübliche aME-Präparate des europäischen Marktes wurden analysiert und auf ihre Zusammensetzung untersucht. Alle Präparate entsprachen den gesetzlichen Anforderung der Fleisch-VO.
3. Das Löslichkeitsverhalten der untersuchten aME-Präparate wurde durch verschieden hohe Temperatureinwirkungen nur geringfügig beeinflusst. Nur bei Sterilisationstemperaturen über 115°C konnte bei den meisten Präparaten eine Denaturierung und eine damit verbundene Löslichkeitsminderung beobachtet werden.
4. Verschiedene Extraktionsverfahren, variiert in Art und Menge des Extraktionsmittels, der Extraktionsdauer und -temperatur sowie der Vorbehandlung und Zerkleinerung des Untersuchungsgutes, wurden auf ihren Gehalt an extrahiertem Eiweiß geprüft. Mittels einer 2-stündigen Extraktion mit phys. Kochsalzlösung vom pH 7,2 im Schüttelwasserbad bei 40°C konnten die höchsten Eiweißgehalte extrahiert werden.
5. 17 aME-Präparate wurden auf ihre Antigenität mittels der Agar-Gel-Diffusion geprüft. Die durch Immunisierung nach HERRMANN (71) hergestellten Antiseren waren denen durch Immunisierung nach KLUGE-WILM (64) hergestellten Antiseren in ihrer Empfindlichkeit überlegen. Während einige Antiseren mit allen der geprüften Präparate stark

positiv reagierten, zeigten andere nur eine sehr schwache oder gar keine Reaktion. Die durch die Immunisierung nach HERRMANN (71) gewonnenen Antiseren reagierten mit allen aME-Präparaten eindeutig positiv.

6. Die mittels des erarbeiteten Extraktionsverfahrens gewonnenen Extrakte aus den mit 0,5; 1,0; 1,5 bzw. 2,0 % aME - berechnet auf den Fleisch-Fettgehalt - versetzten Modellchargen, die 30 Minuten bis auf 70°, 100°, 115° bzw. 125°C (Kerntemperatur) erhitzt worden waren, wurden mittels der indirekten Hämagglutination mit formalinierten, sensibilisierten Hammelerythrozyten auf ihren Gehalt an aME untersucht, und die Ergebnisse der serologischen Untersuchungen mit den Gesamteiweißgehalten der Extrakte verglichen.

E. S U M M A R Y

1. The literature on regulations concerning the processing of disintegrated milk protein in meat products, the technological significance as well as the physico-chemical properties of disintegrated milk protein were discussed. Moreover methods of extraction, preparation of antigen, immunisation, production of serum and identification of disintegrated milk protein in meat products were described.
2. 22 commercial preparations of disintegrated milk protein from the european marked were analysed. These preparations conformed to the regulations of the Fleisch-V0.
3. The solubility of the used preparations of disintegrated milk protein was significantly influenced by higher temperature. A Denaturation of disintegrated milk protein combined with a reduction of solubility could only be observed at temperatures higher than 115°C with most of the preparations.
4. Several extraction methods, varying the sort and quantity of extraction solutions, the time for extraction, temperature as well as pretreatment and homogenisation of the samples, were checked regarding the yield of extracted protein. It could be demonstrated that after a 2 hours' extraction with physiological saline solution at pH 7.2 in a shaking water bath at 40°C the highest protein concentrations were obtained.
5. 17 preparations of disintegrated milk protein were examined by agar-gel-diffusion in view of their anti-

genicity. Antisera which were prepared by immunisation according to HERRMANN (71) were found more sensitive than those prepared after KLUGE-WILM (64). Some of the antisera gave highly positive answers when reacting with all preparations, while others showed only very weak or no reactions. Antisera prepared by immunisation after HERRMANN (71) gave significantly positive responses when reacting with preparations of disintegrated milk protein.

6. Extracts from model batches with 0.5; 1.0; 1.5 and 2.0 % disintegrated milk protein - calculated to the meat-fat content - which were obtained by the above mentioned methods were heated for 30 min to 70°, 100°, 115° and 125°C (nuclear temperature). They were then examined by indirect hemagglutination using sensitive mutton erythrocytes which were treated with formaldehyde, to determine their contents of disintegrated milk protein. The results of the serological investigations were then compared to the total protein contents of the extracts.

F. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. Anson, M.C. and A.E. Mirsky: The reversibility of protein coagulation.
J. phys. Chem. 35 (1935), 185
2. Aurand, L.W., J.W. Brown and I.G. Lecce: Effect of heat on the proteins of milk as revealed by gel and immunoelectrophoresis.
J. Dairy Sci. 46 (1963), 1177
3. Baal van, J.P.W. und J.N. Leget: Nachweis von Casein und Natriumcaseinat in Fleischprodukten.
Z. Lebensm. Unters.-Forsch. 127 (1965), 263
4. Bartels, H.: Gleichzeitige Verarbeitung von "aufgeschlossenen Milcheiweiß" und "Eiklar" bei der Brühwurstherstellung?
Fleischwirtschaft 50 (1970), 786
5. Beisenherz, G., H.J. Boltze, Th. Bücher, R.Czok, K.H. Garbade, E. Meyer-Arendt und G. Pfeleiderer: Diphosphofructose-Aldolase, Phosphoglyceralddehyd-Dehydrogenase, Milchsäure-Dehydrogenase, Glycerophosphat-Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang.
Z. Naturforschung 8b (1953), 555
6. Belitz, H.-D. und J. Schormüller: Aminosäuren, Peptide, Proteine und andere Stickstoffverbindungen.
In: Handbuch der Lebensmittelchemie. Bd I, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1965, S. 167
7. Blix, G., K. Felix, W. Grassmann und J. Trupke: Eiweißstoffe und ihre Abbaustufen.
In: Physiologische Chemie, Lehr- und Handbuch für Ärzte, Biologen und Chemiker. Bd I, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1951, S. 584

8. Braun, G.: Bemerkungen zur Milcheiweißbestimmung in Fleischerzeugnissen.
Z. Lebensm. Unters.-Forsch. 129 (1965/66), 160
9. Brunner, J.R. und Mitarb.: Nomenclature of the proteins of bovine milk. First revision.
J. Dairy Sci. 43 (1960), 901
10. Catsimpoolas, N. and E.W. Meyer: Immunochemical studies of soybean proteins.
J. Agr. Food Chem. Vol. 16 (1968), 128
11. Cohen, E.H.: Protein Changes Related to Ham Processing Temperatures.
I. Effect of Time-Temperature on Amount and Composition of Soluble Proteins.
J. Food Sci. 31 (1966), 746
12. Coons, A.H. and M.H. Kaplan: Lokalisation of antigen in tissue cells. II. Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody.
J. Exper. Med. 91 (1950), 1
13. Dean, H.R. and R.A. Webb: The influence of optimal proportions of antigen and antibody in the serum precipitation reaction.
J. Path. Bact. 29 (1926), 473
14. Degenkolb, E. und M. Hingerle: Eine serologische Schnellmethode zum quantitativen Nachweis von Fremdeiweißzusätzen in hitzedenaturierten Fleischerzeugnissen.
Arch. Lebensmittelhyg. 20 (1969), 73
15. Degenkolb E. und M. Hingerle: Untersuchungen über den serologischen Nachweis von Fremdeiweißzusätzen.
Arch. Lebensmittelhyg. 18 (1967), 241

16. Dittmer, A.: Chemie und Aufbau des Eiweißes.
In: Plasmaeiweiß und Elektrophorese.
3. Aufl., VEB Gustav Fischer Verlag,
Jena 1965, S. 5
17. Edsall, J.T. and J.W. Mehl: The Effect of Denaturing
Agents on Myosin. II. Viscosity and Double
Refraction of Flow.
J. Biol. Chem. 133 (1940), 409
18. Feder, E.: Zur Prüfung von Fleischaschen bei Zusatz
von Eiweißpräparaten zu Fleischwaren.
Z. Lebensm. Unters.-Forsch. 17 (1909), 191
19. Bekanntmachung der Neufassung der Fleisch-Verordnung
vom 11. Dez. 1969 (BGBI. I, S. 2191).
Verwendung von aufgeschlossenem Milcheiweiß
zu Fleischerzeugnissen in der BRD.
20. Fleischmann, O.: Nachweis und Bestimmung von Milcheiweiß
in Fleischerzeugnissen.
Fleischwirtschaft 44 (1964), 985
21. Forschbach, E.: Über aktuelle Fragen des Lebensmittel-
rechts auf dem Gebiet der Fleischwirtschaft.
Arch. Lebensmittelhyg. 13 (1962), 177
22. Freimuth, U. und W. Krause: Nachweis fremder Eiweißkör-
per in Fleischwaren.
Mitt.-Bl. GDCh-Lebensmittelchemie u. gerichtl.
Chemie 24 (1970), 8
23. Freimuth, U. und W. Krause: Nachweis von Fremdproteinen
in Fleischerzeugnissen.
Die Nahrung 14 (1970), 19
24. Freimuth, U. und W. Krause: Elektrophoretischer Nachweis
von Bindemitteln auf Milcheiweißbasis in
Fleischerzeugnissen.
Die Nahrung 13 (1969), 447

25. Fromm, G.: Zum immunologischen Nachweis von aufgeschloss-
enem Milcheiweiß in Fleischkonserven.
Arch. Hyg. 151 (164), 702
26. Gennip van, A.H.M.: Einige neue Anwendungen von Milchei-
weiß (Natriumkaseinat).
Kolloquium: Milcheiweiß und die industrielle
Lebensmittelherstellung besonders Fleisch-
waren. 25. und 26. Juni 1970,
De Meijerij, Zuid-Nederlandse Melkindustrie
N.V. Veghel
27. Gerigk, K. und H. Krüger: Untersuchungen zur Extraktion
von Fremdeiweiß aus Fleischwaren.
Zbl. Vet. Med. B 19 (1972), 226
28. Grabar, P. et C.A. Williams: Méthode permettant l'étude
conjuguéedes propriétés électrophorétiques
et immunochimiques d'un mélange de protéines.
Biochim. Biophys. Acta 10 (1953), 193
29. Graham-Smith, G.S.: The biological or precipitin test
for blood, considered mainly from its
medico-legal aspect.
J. Hyg. 2 (1903), 354
30. Günther, H.: Bestimmung von Fremdeiweiß in Fleischwaren.
Arch. Lebensmittelhyg. 20 (1969), 97
31. Günther, H.: Bestimmung von Fremdeiweiß in Fleischwaren,
Arch. Lebensmittelhyg. 20 (1969), 128
32. Gugler, E., M. Bein und G.v. Mural: Über immunelektropho-
retische Untersuchungen an Kuhmilchproteinen.
Schweiz. med. Wschr. 89 (1959), 1172
33. Hanson, L.A.: Immunological technique for the detection
of milk proteins in food products.
Nord. Vet. med. 16 (1964), 201

34. Hanson, L.A. and B. Johansson: Immune electrophoretic analysis of bovine milk and purified bovine milk protein fractions.
Experientia 15 (1959), 377
35. Hanson, L.A.: Immunological analysis of bovine blood serum and milk.
Experientia 15 (1959), 471
36. Haupt, H.: Erläuterung zur Verordnung über Fleisch und Fleischerzeugnisse (Fleisch-Verordnung) vom 19. Dezember 1959.
Arch. Lebensmittelhyg. 11 (1960), 1
37. Haurowitz, F.: Dilatometrische Untersuchungen der Hitze-denaturierung von Eiweißlösungen.
Kolloid-Z. 71 (1935), 198
38. Haurowitz, F.: Eiweißdenaturierung.
In: Hoppe-Seyler/Thierfelder:
Handbuch der physiologisch- u. pathologisch-
chemischen Analyse. Bd IV/1, Springer-Verlag,
Berlin-Göttingen-Heidelberg 1960, S. 116
39. Haurowitz, F.: Strukturen und Wirkungsweisen der Anti-
körper.
Naturwiss. 56 (1969), 189
40. Hellmann, H.: Eiweiß.
Verlag Curt E. Schwab, Stuttgart 1952
41. Henning, H.-J.: Löslichkeit.
In: Handbuch der Lebensmittelchemie.
Bd II/1, Springer-Verlag, Berlin-Heidel-
berg-New York 1965, S. 179
42. Herrmann, Ch.: Gewinnung von Antiseren für den Nach-
weis von Fremdeiweiß in hocherhitzten
Fleischerzeugnissen.
Arch. Lebensmittelhyg. 19 (1968), 270

43. Herrmann, Ch. und L. Kotter: Serologische Verfahren bei der Überwachung von Fleischerzeugnissen. Arch. Lebensmittelhyg. 19 (1968), 265
44. Herrmann, Ch.: Serologische Untersuchungsmethoden in der tierärztlichen Lebensmittelüberwachung. Wehrmed. 7 (1969), 16
45. Herrmann, Ch., D. Holpert und G. Pfeiffer: Zur serologischen Erfassung von aufgeschlossenem Milcheiweiß in hocherhitzten Fleischerzeugnissen. Arch. Lebensmittelhyg. 17 (1966), 12
46. Herrmann, Ch.: Über die zugleich quantitative Differenzierung von erhitztem Eiweiß mittels der indirekten Hämagglutination. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 78 (1965), 370
47. Herrmann, Ch.: Über den Nachweis von hitzedenaturiertem Hühnereiklar in Fleischwaren mit Hilfe der indirekten Hämagglutination. Diss. med. vet. München 1963
48. Herrmann, Ch.: Vergleich und Bewertung verschiedener Methoden zum Nachweis von Fremdeiweiß in Fleisch- und Wurstwaren. Vortrag, gehalten auf der 15. Arbeitstagung des Arbeitskreises Lebensmittelhygienischer Tierärztlicher Sachverständiger - ALTS - in Berlin. 2. bis 4. Mai 1973
49. Herrmann, Ch. und Ch. Merkle: Zur Standardisierung und Konservierung der sensibilisierten Hammelerythrozyten für die indirekte Hämagglutination zum Nachweis von Fremdeiweiß. Arch. Lebensmittelhyg. 22 (1971), 189

50. Hipp, N.J., M.L. Groves, J.H. Custer and T.L. Mc Meekin:
Separation of α -, β - and γ - Casein.
J. Dairy Sci. 35 (1952), 272
51. Höpner, Th.: Molekulare Immunologie.
Chemie unserer Zeit 3 (1969), 65
52. Holpert D.: Zum histochemischen und immunhistochemischen
Nachweis von Milcheiweiß in Brühwürsten.
Diss. med. vet. München 1965
53. Hoog de, P., S. van den Reek und F. Brouwer: Nachweis und
Bestimmung von aufgeschlossenem Milcheiweiß
und Sojaproteinen in Fleischerzeugnissen.
Fleischwirtschaft 50 (1970), 1663
54. Hoog de, P.: Analysierung von fleischfremdem Eiweiß in
hocherhitzten Fleischerzeugnissen, insbe-
sondere von Milcheiweiß und Sojaprotein.
Kolloquium: Milcheiweiß und die industrielle
Lebensmittelherstellung besonders Fleisch-
waren. 25. und 26. Juni 1970, De Meijerij,
Zuid-Nederlandse Melkindustrie N.V. Veghel
55. Hunziker, H.G. and N.P. Tarassuk: Chromatographic evi-
dence for heat-induced interaction of α -Lact-
albumin and β -Lactoglobulin.
J. Dairy Sci. 48 (1965), 733
56. Inichow, G.S.: Biochemie der Milch und der Milchprodukte.
VEB-Verlag Technik, Berlin 1959, S.20
57. Jaenicke, R.: Wärmeaggregation und Wärmedenaturierung von
Proteinen.
Dechema Monographien 56 (1965), 207
58. Jeness, R. und S. Patton: Grundzüge der Milchchemie,
Bayer. Landwirtschaftsverlag, München-Basel-
Wien 1959

59. Jübermann, O.: Verteilen und Extrahieren.
In: Houben-Weyl: Methoden der organischen Chemie. Bd I/1, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1958, S. 223
60. Karte, H.: Untersuchungen zur Frage der Hitzeschädigung der Milchproteine in evaporierter Milch.
Milchwiss. 11 (1956), 420
61. Kasper, W.: Das "Warum" einer Emulsion.
Bayer. Metzgermeister, Nr.17, vom 24. Apr. 1971, S. 4
62. Kiermeier, F. und O. Kirschmeier: Quantitative elektrophoretische Analyse der Milchproteine.
Z. Lebensm. Unters.-Forsch. 125 (1964), 341
63. Kluge, H.: Über den Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß und Magermilchpulver in Fleisch und Wurst.
Z. Lebensm. Unters.-Forsch. 80 (1940), 209
64. Kluge-Wilm, R.: Serologischer Nachweis von Milcheiweiß in hocherhitzten Fleischwaren.
Diss. med. vet. Berlin 1967
65. Kotter, L. und G. Terplan: Neue Erkenntnisse bei der Herstellung von Fleischwaren unter besonderer Berücksichtigung der verfügbaren und der zulassungsbedürftigen Zusatzstoffe.
Arch. Lebensmittelhyg. 12 (1961), 169
66. Kotter, L., G. Terplan, W. Kreuzer und F. Lorch: Aktuelles zur Lebensmittelüberwachung.
Arch. Lebensmittelhyg. 14, (1963), 127, 147, 191 und 223
67. Kotter, L. und O. Prändel: Chemisch-physikalische Vorgänge bei der Brühwurstfabrikation.
Arch. Lebensmittelhyg. 7 (1956), 219

68. Kotter, L.: Zur Differenzierung der Proteine von Fleischwaren.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 77 (1964), 433
69. Kotter, L. und B. Rolle: Aminosäuren und Aminosucker als Kriterien bei der Beurteilung von Fleischwaren.
Wien. Tierärztl. Mschr. 48 (1961), 372
70. Kotter, L., H. Schulze und Ch. Herrmann: Lebensmittelrechtliche Beurteilung von Fremdeiweißzusätzen zu Fleischerzeugnissen.
Arch. Lebensmittelhyg. 19 (1968), 263
71. Kotter, L., Ch. Herrmann, Ch. Ring und G. Corsico: Untersuchungen zur Steigerung der Antikörperbildung gegen erhitztes Eiweiß mittels Metallverbindungen.
Zbl. Vet. Med. B 13 (1966), 613
72. Kotter, L., A. Palitzsch und Ch. Herrmann: Technologische Bedeutung von Fremdeiweiß bei der Fleischwarenverarbeitung.
Arch. Lebensmittelhyg. 19 (1968), 261
73. Kotter, L.: Milcheiweiß und Milch als Zusatz zur Wurstwaren.
Der Lebensmitteltierarzt 5 (1954), 219
74. Kotter, L.: Serologische Methoden zur Untersuchung von Proteinen.
In: Handbuch der Lebensmittelchemie.
Bd II/2, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1967, S. 198
75. Kotter, L., A. Palitzsch und A. Fischer: Weitere Studien über die Vorgänge bei der Herstellung von "Brühwurst" und die Wirkung verschiedener Hilfsstoffe.
Fleischwirtschaft 49 (1969), 1623

76. Kotter, L. und Ch. Herrmann: Die indirekte Hämagglutination als Nachweisreaktion für Fremdeiweiße.
Arch. Lebensmittelhyg. 19 (1968), 267
77. Kotter, L., Ch. Herrmann und G. Corsico: Zum quantitativen Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß in hocherhitzten Fleischwaren mit Hilfe der indirekten Hämagglutination.
Z. Lebensm. Unters.-Forsch. 133 (1966), 15
78. Kreveld van, A.: Kasein und Kaseinate.
C.I.I.A. Symposium 1968
79. Krüger, H. und D. Großklaus: Untersuchungen zum serologischen Nachweis von Sojaprotein in erhitzten Fleischerzeugnissen.
Fleischwirtschaft 50 (1970), 1529 (1. Mitt.), 51 (1971), 181 (2. Mitt.) u. 51 (1971), 315 (3. Mitt.)
80. Kuschfeldt, D., W. Thiel und D. Wuppermann: Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß in Brühwurstzeugnissen.
Fleischwirtschaft 50 (1970), 929
81. Kutscher, W. und W. Pfaff: Über die Nährwerterhöhung und Strukturhaltung von Fleisch- und Wurstkonserven.
Fleischwirtschaft 11 (1959), 568 u. 13 (1961), 283
82. Kutscher, W., W. Nagel und W. Pfaff: Nachweis und quantitative Bestimmung von Milcheiweiß in Fleischerzeugnissen.
Z. Lebensm. Unters.-Forsch. 115 (1961), 117
83. Landsteiner, K.: Über die Bedeutung der Proteinkomponente bei den Präzipitinreaktionen der Azoproteine. XIII. Mitt. über Antigene.
Biochem. Z. 93 (1919), 106

84. Larson, B.L. and G.D. Roller: Heat denaturation of the specific serum proteins in milk.
J. Dairy Sci. 38 (1955), 351
85. Lindner, A.F. und A. Patschky: Zum quantitativen Nachweis von Magermilchpulver in Fleisch- und Wurstwaren.
Z. Lebensm. Unters.-Forsch 74 (1937), 11
86. Lindquist, B.: Casein and the action of rennin.
Dairy Sci. Abstr. 25 (1963), 257
87. Loeffler, F.: Über ein neues Verfahren zur Gewinnung von Antikörpern.
Dt. Med. Wschr. 30 (1904), 1913
88. Meienhofer, J. und H. Zahn: Gewinnung und Reindarstellung von Proteinen.
In: Hoppe-Seyler/Thierfelder: Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse, Bd IV/1, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1960, S. 1
89. Mellander, O.: Elektrophoretische Untersuchung von Casein.
Biochem. Z. 300 (1939), 240
90. Neurath, H., G.R. Cooper and J.O. Erickson: Denaturation of proteins and its apparent reversal.
J. physic. Chem. 46 (1942), 203
91. Olsmann, W.J.: Elektrophoretischer Nachweis von fleischfremden Eiweißen in Fleischerzeugnissen.
Z. Lebensm. Unters.-Forsch. 141 (1969), 253
92. Olsmann, W.J.: Electrophoretic detection of non-meat proteins in meat products.
13th European Meeting of Meat Research Workers, Rotterdam 1967
93. Ouchterlony, Ö.: Diffusion in-gel-methods for immunological analysis I.
Progr. Allergy 5 (1958), 1

94. Ouchterlony, Ö.: Diffusion in-gel-methods for immunological analysis II.
Progr. Allergy 6 (1962), 30
95. Ouchterlony, Ö.: Antigen-antibody reactions in gels.
Ark. Kemi 1 (1949), 43 (2 Mitt.) u. 1 (1949), 55 (3. Mitt.)
96. Ouchterlony, Ö.: Antigen-antibody reactions in gels.
Ark. Kemi Mineralogi Geol. 26B (1949), 1
97. Oudin, J.: La diffusion d'un antigène dans une colonne de gel contenant les anticorps précipitants homologues. Etude quantitative des trois principales variables.
Comptes rend. Acad. Sci. 228 (1949), 1890
98. Pauling, L. and D. Pressmann: Reactions of antiserum homologous to p-azophenyltrimethylammonium group.
J. Amer. Chem. Soc. 68 (1946), 2643
99. Peltzer, J.: Einige einfache chromatographische Verfahren für die Lebensmittelkontrolle.
Mitt.-Bl. GDCh-Lebensmittelchemie u. gerichtl. Chemie 11 (1957), 31 u. 109, 12 (1958), 14
100. Pendl, I. und K. Felix: Milch-Proteine.
In: Hoppe-Seyler/Thierfelder: Handbuch der physiologisch- u. pathologisch-chemischen Analyse. Bd IV/1, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1960, S. 401
101. Perlmann, G.E. The nature of phosphorus linkages in phosphoproteins.
Advances in Protein Chem. 10 (1955), 1
102. Pfaff, W.: Über die Nährwerterhöhung und Strukturierung von Fleisch- und Wurstkonserven.
II. Bericht, Fleischwirtschaft 11 (1959), 986

103. Putnam, F.W.: Protein Denaturation.
Neurath-Bailey, Proteins Bd IB, S. 809
104. Ramon, G.: Sur une technique de titrage in vitro du
serum antidiphtherique.
Compt. rend. Soc. Biol. 86 (1922), 711
105. Ring, Ch.: Vermehrte Bildung von Antikörpern gegen er-
hitztes Eiweiß mittels Metallverbindungen.
Diss. med. vet. München 1964
106. Ristow, R.: Vorgetäuschter Milcheiweißzusatz.
Fleischwirtschaft 50 (1970), 156
107. Rose, D.: Protein stability problems.
J. Dairy Sci. 48 (1965), 139
108. Roulet, D.L.A., M. Bein und G.v. Muralt: Immunelektropho-
retische Untersuchungen an Kuhmilchpräparaten.
Milchwiss. 16 (1961), 415
109. Scheidegger, J.J.: Une micro-méthode de l'immuno-électro-
phorèse.
Int. Arch. Allergy 7 (1955), 103
110. Scheunert, H. und A. Trautmann: Lehrbuch der Veterinär-
Physiologie.
Parey-Verlag, Berlin 1951
111. Schmidt, W.A.: Studien über Präzipitinreaktion und er-
hitzte Eiweißstoffe.
Biochem. Z. 14 (1908), 294
112. Schmidt, W.A. Untersuchungen über die Erzeugung hoch-
wertiger Muskeleiweiß-Antisera für die
Fleischdifferenzierung.
Biochem. Z. 5 (1907), 492
113. Schmidt, W.A.: Über ein Präzipitin, welches es ermöglicht,
auch gekochtes (unlösliches) Eiweiß zu
differenzieren.
Z. Immun. Forsch. 13 (1912), 166

114. Schmidt, H.: Fortschritte der Serologie.
2. Aufl. Verlag Steinkopff, Darmstadt 1955,
S. 364 u. 744
115. Schmidt, H.: Immunchemie und Serologie.
Zbl. Bakt. I. Orig. 153 (1948/49), 142
116. Schmidt, D.G.: Distribution of the genetic variants of α_{s1} -, β - and κ -Casein in the milk of cows of the three main breeds in the Netherlands.
In: XVII. Internationaler Milchwirtschaftskongreß, Section A:2, München 1966, S. 259
117. Schmidt, D.G.: Genetische varianten van melkereiwitten.
Milchwiss. 21 (1966), 237
118. Schmidt, G.: Phosphoproteide.
In: Hoppe-Seyler/Thierfelder, Handbuch der physiologisch- u. pathologisch-chemischen Analyse, Bd IV/1, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1960, S. 618
119. Schneck, A. und M. Ziegler: Der Nachweis von aufgeschlossenen Milcheiweiß in Wurstwaren.
Vorratspfl. u. Lebensmittelforschung 1 (1938), 494
120. Schulte, K.E. und F. Müller: Elektrophoretische Studien an Milchproteinen.
Milchwiss. 10 (1955), 90 (1. Mitt.) u. 10 (1955), 270 (5 Mitt.)
121. Schut, J.: Zusammenhang zwischen Fettemulgierung und Wasserretention in bzw. Konsistenz von Brühwurst.
Kolloquium: Milcheiweiß und die industrielle Lebensmittelherstellung besonders Fleischwaren. 25. und 26. Juni 1970, De Meijerij, Zuid-Nederlandse Melkindustrie N.V. Veghel

122. Schut, J.: Zur Emulgierbarkeit von Schlachtfetten bei der Herstellung von Brühwurst.
Fleischwirtschaft 48 (1968), 1029 (1. Mitt.)
u. 49 (1969), 67 (3. Mitt.)
123. Sinell, H.-J.: Walfleischuntersuchungen.
Fleischwirtschaft 11 (1959), 191
124. Sinell, H.-J.: Über die Differenzierung von Walfleisch in Lebensmitteln.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 72 (1959), 213
125. Sinell, H.-J.: Probleme bei der Spezies-Identifizierung von Proteinen in Lebensmitteln.
Arch. Lebensmittelhyg. 19 (1968), 121
126. Sinell, H.-J.: Versuche zum biologischen Nachweis hitzedenaturierter Muskelproteine.
Zbl. Vet. Med. B 8 (1961) 57 u. 101
127. Sinell, H.-J. und R. Kluge-Wilm: Immunelektrophoretischer Nachweis von aufgeschlossenem Milcheiweiß in erhitzten Fleischerzeugnissen und Versuche zu einer quantitativen Auswertung.
Zbl. Vet. Med. B 15 (1966), 802
128. Sinell, H.-J. und I. Mentz. Serologische Spezies-Identifizierung hitzedenaturierter Muskelproteine mittels Harnstoffextraktion.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 82 (1969), 55
129. Stadelmann, W.: Nachweis und quantitative Bestimmung von Milcheiweiß in Fleischerzeugnissen.
Z. Lebensm. Unters.-Forsch. 117 (1962), 24
130. Staudinger, H.: Über die Grundlagen der makromolekularen Chemie.
Naturwiss. 42 (1955), 221
131. Stavitsky, A.B.: Micromethods for the study of proteins and antibodies.
J. Immunol. 72 (1954). 360 (1. Mitt.) u.
72 (1954), 368 (2. Mitt.)

132. Stavitsky, A.B. and E.R. Arquilla: Micromethods for the study of protein and antibodies.
J. Immunol. 74 (1955), 306 (3. Mitt.)
133. Stutz-Baasch, M.-L.: Versuche zur Standardisierung des Nachweises von aufgeschlossenem Milcheiweiß in Fleischerzeugnissen mit Hilfe der Agglutination.
Diss. med. vet. München 1972
134. Teppema, P.: Spezifische Adsorption von Ionen an Eiweißen.
Kolloquium: Milcheiweiß und die industrielle Lebensmittelherstellung besonders Fleischwaren. 25. und 26. Juni 1970, De Meijerij, Zuid-Nederlandse Melkindustrie N.V. Veghel
135. Thalacker, R.: Bestimmung von Milcheiweiß in Fleischerzeugnissen.
Dt. Lebensmittel-Rdsch. 59 (1963), 111
136. Thalacker, R.: Der Einsatz der Dichtegradienten-Zentrifugation in der Lebensmittelanalytik.
Dt. Lebensmittel-Rdsch. 59 (1963), 192
137. Thalacker, R.: Bestimmung von Milcheiweiß in Fleischerzeugnissen.
Mitt.-Bl. GDCh-Lebensmittelchemie u. gerichtl. Chemie 17 (1963), 210
138. Thalacker, R.: Vereinfachtes Verfahren zur Ermittlung des Phosphoprotein-Phosphors in Fleischerzeugnissen.
Mitt.-Bl. GDCh-Lebensmittelchemie u. gerichtl. Chemie 20 (1966), 45
139. Thalacker, R.: Über den Phosphoprotein-Phosphorgehalt einiger Fleisch- und Wurstwaren.
Dt. Lebensmittel-Rdsch. 65 (1969), 373

140. Thalacker, R.: Abspaltung von Phosphoprotein-Phosphor bei aufgeschlossenem Milcheiweiß durch Erhitzung. Dt. Lebensmittel-Rdsch. 60 (1964), 211
141. Thompson, M.P. and Mitarb.: Nomenclature of the proteins of cow's milk. Second revision. J. Dairy Sci. 48 (1965), 159
142. Tokita, F. and F. Takahashi: Comparative examination on the antigenicity of casein hydrolyzed by some proteases. Milchwiss. 27 (1972), 422
143. Tongur, W.S.: Einige Fragen der Umkehrbarkeit der Eiweißdenaturierung. Zur Biochemie des Eiweißes. Sammlung sowjetischer Arbeiten, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 1956, S. 38
144. Uhlenhuth, P. und W. Seiffert: Die biologische Eiweißdifferenzierung mittels Präzipitation. In: Kolle-Kraus-Uhlenhuth: Handbuch der pathogenen Mikroorganismen, Bd III/1, Verlag G. Fischer, Jena 1930, S. 365
145. Wadsworth, C. and L.A. Hanson: Comparative analysis of immune electrophoretic precipitates employing a modified immune electrophoretic technique. Int. Arch. Allergy 17 (1960), 165
146. Warnecke, M.O. and R.L. Saffle: Serological identification of animal proteins. 1. Mode of injection and protein extracts for antibody production. J. Food Sci. 33 (1968), 131
147. Wunderly, Ch.: Die quantitative Bestimmung der Hämagglutinationsprobe. Behringwerk-Mitt. 1958

148. Wyler, O.: Immunologischer Nachweis von Milcheiweiß und Sojaeiweiß.
Fleischwirtschaft 51 (1971), 1743 (1. Mitt.)
149. Wyler, O. und J.-J. Siegrist: Einfache, empfindliche Nachweismethoden für fleischfremde, tierische Eiweißarten.
Mitt. Lebensmittel-Unters. 56 (1965), 299
150. Yoshimo, U. and Mitarb.: Comparative study on the changes of the casein fractions on heating.
Agric. Biol. Chem. (Tokyo) 28 (1964), 82
151. Zittle, C.A., M.P. Thompson, J.H. Custer and J. Cerbulis: α -casein, β -lactoglobulin interaction in solution when heated.
J. Dairy Sci. 45 (1962), 807
152. Zwetkova, Z.: Nachweis von Natriumcaseinat in Fleischzeugnissen.
Fleischwirtschaft 48 (1968), 1486

Am Ende meiner Arbeit möchte ich
Herrn Prof. Dr. Dr.h.c. L. Kotter
für die Überlassung des Themas und
des Arbeitsplatzes sehr herzlich
danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt
Fräulein Dr. Herrmann für die
wertvollen Anregungen, die immer
gewährte Unterstützung und die
kritische Durchsicht des Manuskripts.

L e b e n s l a u f

Am 5. Juni 1944 wurde ich als Sohn des Juristen Edgar von Pickardt und seiner Ehefrau Ingeborg, geborene von Magnus, in Litzmannstadt/Warthegeau geboren.

Von 1950 bis 1954 besuchte ich die Knabenschule in Varel, ab 1954 das Gymnasium Varel. Am 31. Januar 1964 bestand ich die Reifeprüfung an dieser Schule .

Von April 1964 bis März 1966 leistete ich meinen Wehrdienst bei der Bundeswehr in Wildeshausen ab.

Im Sommersemester 1966 begann ich mit dem Studium der Veterinärmedizin an der Universität München und bestand dort am 24. März 1971 die Tierärztliche Prüfung. Im August 1971 erhielt ich die Bestallung zum Tierarzt.

Von Januar bis Dezember 1972 war ich als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Lebensmittel tierischen Ursprungs der Tierärztlichen Fakultät der Universität München beschäftigt.

Am 2. Juli 1945 wurde das als Folge des Krieges
 durch den Verlust von vielen deutschen Bürgern
 verlassene Dorf in die Gemeinde eingegliedert.

Am 1. Juli 1945 wurde das Dorf in die Gemeinde
 eingegliedert. Am 1. Juli 1945 wurde das Dorf
 in die Gemeinde eingegliedert.

Am 1. Juli 1945 wurde das Dorf in die Gemeinde
 eingegliedert. Am 1. Juli 1945 wurde das Dorf
 in die Gemeinde eingegliedert.

Am 1. Juli 1945 wurde das Dorf in die Gemeinde
 eingegliedert. Am 1. Juli 1945 wurde das Dorf
 in die Gemeinde eingegliedert.

Am 1. Juli 1945 wurde das Dorf in die Gemeinde
 eingegliedert. Am 1. Juli 1945 wurde das Dorf
 in die Gemeinde eingegliedert.

